

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS J. SCHLITT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CD133-POSITIVE TUMORSTAMMZELLEN DER  
KOLONKARZINOMLINIE CT26 IN EINEM MAUSMODELL**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Annette Christiane Neuwinger



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS J. SCHLITT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CD133-POSITIVE TUMORSTAMMZELLEN DER  
KOLONKARZINOMLINIE CT26 IN EINEM MAUSMODELL**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Annette Christiane Neuwinger

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Marc-H. Dahlke, Ph.D.

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Klebl

Tag der mündlichen Prüfung: 03. September 2012

*Gewidmet*  
*meinen Eltern und*  
*meiner Schwester*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	- 1 -
1 Einleitung.....	- 4 -
1.1 Die Stammzelle .....	- 5 -
1.1.1 Schlüsseleigenschaften .....	- 5 -
1.1.2 Stammzellen des Gastrointestinaltrakts .....	- 7 -
1.2 Die Tumorstammzelle.....	- 8 -
1.2.1 Tumor als aberrantes Organ.....	- 8 -
1.2.2 Modelle der Tumorentstehung.....	- 9 -
1.2.3 Entstehungsmechanismus des Kolonkarzinoms .....	- 11 -
1.3 Entwicklung der Tumorstammzellforschung.....	- 12 -
1.3.1 Tumorinitiierende Zellen im hämatopoetischen System .....	- 13 -
1.3.2 Tumorinitiierende Zellen in soliden Tumoren.....	- 13 -
1.4 Das Oberflächenprotein CD133.....	- 15 -
1.5 Die Zelllinie CT26 .....	- 17 -
1.6 Fragestellung .....	- 18 -
2 Material und Methoden.....	- 21 -
2.1 Material .....	- 21 -
2.1.1 Verbrauchsmaterial .....	- 21 -
2.1.2 Chemikalien .....	- 22 -
2.1.3 Zusammensetzung der Puffer, Lösungen und Medien .....	- 23 -
2.1.4 Antikörper und Sekundärreagenzien .....	- 24 -
2.2 Labormethoden .....	- 26 -
2.2.1 Zellkultur .....	- 26 -
2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus solidem Tumor .....	- 27 -
2.2.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe ( <i>Limiting Dilution Assay</i> ) .....	- 28 -

2.2.4 Durchflusszytometrie.....	- 29 -
2.2.5 CFSE-Färbung .....	- 31 -
2.2.6 Radiatio und Chemotherapie mit 5-FU.....	- 32 -
2.2.7 Herstellung von sphärischen Kulturen.....	- 32 -
2.3 Versuche am Mausmodell.....	- 33 -
2.3.1 Versuchstiere .....	- 33 -
2.3.2 Anästhesie und Narkotika.....	- 34 -
2.3.3 Injektion von Tumorzellen.....	- 34 -
2.3.4 Frequenzbestimmung der Tumorstammzellen.....	- 34 -
2.3.5 Implantation von soliden Tumorstücken .....	- 36 -
2.3.6 Entnahme des Tumors .....	- 36 -
3 Ergebnisse.....	- 37 -
3.1 Charakterisierung der Zelllinie CT26 .....	- 37 -
3.1.1 Nachweis einer CD133 <sup>+</sup> -Subpopulation.....	- 37 -
3.1.2 Generierung subkutaner Tumore in vivo möglich.....	- 38 -
3.1.3 Positivität für CD44.....	- 39 -
3.2 Analyse der Proliferationseigenschaften der Zelllinie CT26 in vitro .....	- 39 -
3.2.1 Bestimmung der Proliferationsfrequenz im Limiting Dilution Assay. ....	- 40 -
3.2.2 Teilungsfähigkeit jeder Zelle in der CFSE-Färbung.....	- 41 -
3.2.3 Keine Ausbildung sphärischer Kulturen.....	- 42 -
3.2.4 Funktionelle Anreicherung durch Radiatio und Chemotherapie .....	- 43 -
3.3 Tumorgenerierungspotential der Zelllinie CT26 im Nacktmausmodell .....	- 46 -
3.3.1 Fraktion der CD133-positiven Zellen wird in vivo größer .....	- 46 -
3.3.2 Reisiolierte Zellen haben weniger Tumore initiiert .....	- 47 -
3.3.3 Tumore aus reisiolierten Zellen sind kleiner und entstehen später.....	- 50 -
3.3.4 Zusammenfassung .....	- 53 -

4	Diskussion.....	- 55 -
4.1	Konzept „Stammzelle“.....	- 56 -
4.2	Tumorstammzelltheorie .....	- 57 -
4.2.1	Analogien zwischen Stammzellen und tumorinitiierenden Zellen .....	- 57 -
4.2.2	Mechanismen der Tumorentstehung.....	- 58 -
4.2.3	CD133 als Tumorstammzellmarker.....	- 59 -
4.2.4	Bedeutung von CD133 als Stammzellmarker gerechtfertigt? .....	- 61 -
4.2.5	Weitere potentielle Tumorstammzellmarker .....	- 64 -
4.3	Mausmodell.....	- 66 -
4.3.1	Erhöhter Anteil CD133 <sup>+</sup> -Zellen in vivo.....	- 67 -
4.3.2	Frequenz tumorinitiierender Zellen in vivo .....	- 68 -
4.4	Anreicherung CD133 <sup>+</sup> -Tumorzellen.....	- 70 -
4.5	Klinischer Bezug.....	- 72 -
4.6	Fazit.....	- 77 -
5	Zusammenfassung .....	- 79 -
6	Anhänge .....	- 82 -
6.1	TNM- und UICC-Klassifikation des Kolonkarzinoms .....	- 82 -
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	- 84 -
6.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	- 86 -
7	Literaturverzeichnis .....	- 88 -
8	Lebenslauf.....	- 97 -
9	Eidesstattliche Erklärung .....	- 98 -
10	Danksagung .....	- 99 -



# 1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist auf Grund seiner hohen Prävalenz von weitreichender gesellschaftlicher und ökonomischer Bedeutung. Bedingt durch einen höheren Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung, die weite Verbreitung eines „wohlstandsassoziierten Lebensstils“ und möglicherweise auch Erfolge in der Früherkennung hat die Inzidenz und die Prävalenz des kolorektalen Karzinoms in Deutschland seit den 1950er Jahren bis heute kontinuierlich zugenommen. Für Frauen stellt es nach dem Mammakarzinom mit ca. 32.000 neuen Fällen pro Jahr die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung dar. Bei Männern werden die jährlich gut 36.000 Neuerkrankungen nur vom Prostatakarzinom übertroffen. Insgesamt beträgt das Lebenszeitrisko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken in Deutschland zurzeit etwa 6%, wobei die Erkrankung vor allem Patienten in höherem Lebensalter betrifft<sup>52</sup>.

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland inzwischen zur zweithäufigsten tumorbedingten Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen geworden. Im Jahre 2006 starben 13.800 Männer und 13.500 Frauen an einem kolorektalen Karzinom<sup>52</sup>. Die Überlebensrate ist stark davon abhängig, in welchem Stadium die Krankheit erstmals diagnostiziert wird. Man unterscheidet generell zwischen Kolon- und Rektumkarzinom, wobei als Grenzmarke eine Distanz von 16 cm zwischen aboralem Tumorrand und Anokutanlinie gilt. Da in der vorliegenden Arbeit mit einer murinen Zelllinie des Kolonkarzinoms gearbeitet wurde, wird nachfolgend vorwiegend auf das Kolonkarzinom eingegangen. In den westlichen Ländern ist die 5-Jahres-Überlebensrate beim Kolonkarzinom mit lokal begrenztem Wachstum relativ günstig, hier geht man im UICC Stadium I (T1-2 N0) von einer 5-Jahres-Überlebensrate von 93% aus, in den Stadien IIa und IIb (T3-T4 N0) von 72% - 85%. Bei Befall der regionalen Lymphknoten wird abhängig von der Stadieneinteilung IIIa (T1-2 N1), IIIb (T3-4 N1) und IIIc (Tx N2) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von respektive 83%, 64% und 44% gerechnet. Im Falle einer Fernmetastasierung sinkt die Überlebensrate jedoch drastisch ab, so dass im Stadium IV (Tx Nx M1) weniger als 10% der Erkrankten die ersten fünf Jahre überleben<sup>1,81</sup>. (Zur genaueren Erläuterung der TNM- und UICC-Klassifikation des Kolonkarzinoms siehe Abschnitt 6.1.)

Zusammenfassend muss man feststellen, dass trotz verbesserter Therapieoptionen und steigender Überlebenszeiten das kolorektale Karzinom weiterhin für einen hohen Anteil

der tumorbedingten Todesursachen in Deutschland verantwortlich ist. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die Forschung im Bereich des Kolonkarzinoms weiter zu intensivieren und die der Tumorentstehung zugrunde liegenden Pathomechanismen auf zellulärer Ebene zu entschlüsseln. Zudem eröffnen sich mit der Formulierung der Tumorstammzelltheorie gänzlich neue Optionen in der Therapie des Kolonkarzinoms.

Die Tumorstammzelltheorie geht davon aus, dass ein Tumor einen hierarchischen, heterogenen Zellaufbau aufweist. Nur eine geringe Anzahl langsam proliferierender sogenannter Tumorstammzellen halten das Wachstum des Tumors aufrecht, während die Hauptmasse des Tumors von ausdifferenzierten Tochterzellen gebildet wird. Die klassischen Therapieansätze zielen hauptsächlich auf die Vernichtung schnell proliferierender Tumorzellen und eine rasche Verringerung des Tumorumfanges ab, wobei die Population der tumorinitiierenden Zellen möglicherweise nicht tangiert wird. Auf diese Weise lassen sich Rezidive und das Auftreten von Metastasen nach augenscheinlicher Remission erklären. Unter Berücksichtigung der Tumorstammzelltheorie muss die Tumorthherapie jedoch darauf abzielen, spezifisch die Population der Tumorstammzellen zu identifizieren und deren Proliferation zu unterbinden. Falls es gelingt, Stammzellen solider Tumore prospektiv zu charakterisieren und zu isolieren, sollte es möglich sein, effizientere diagnostische Marker und therapeutische Ziele zu definieren. So könnte eine Verbesserung der Überlebensraten besonders im metastasierten Stadium des Kolonkarzinoms erreicht werden<sup>92</sup>.

## **1.1 Die Stammzelle**

### **1.1.1 Schlüsseigenschaften**

Viele menschliche Gewebetypen unterziehen sich einer raschen und ständigen Zellerneuerung. Um die Komplexität und Architektur der Gewebestruktur zu gewährleisten, ist dieser Prozess streng reguliert. Unter physiologischen Bedingungen wird dieser Vorgang von einer kleinen Minderheit langlebiger, undifferenzierter Zellen

mit außergewöhnlichem Wachstumspotential aufrecht erhalten, bekannt als *Stammzellen*. Diese zeichnen sich durch drei Charakteristika aus:

1. *Differenzierung* – die Fähigkeit eine heterogene Nachkommenschaft an Zellen hervorzubringen, die sich weiterhin differenzieren und spezialisieren gemäß des hierarchischen Aufbaus der Gewebestruktur, um beständig die kurzlebigen, reifen Gewebelemente zu erneuern.
2. *Selbsterneuerung* – die Fähigkeit neue Stammzellen auszubilden mit identischem Potenzial zur Proliferation, Expansion und Differenzierung, um somit den Pool der Stammzellen zu erhalten.
3. *Homöostatische Kontrolle* – die Fähigkeit Differenzierung und Selbsterneuerung entsprechend den Umweltsignalen und genetischen Rahmenbedingungen zu modulieren und auszubalancieren<sup>27</sup>.

Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen stammen aus den ersten Zellteilungen der befruchteten Eizelle und können zu allen Zellen des Organismus ausdifferenzieren. Sie werden daher als pluripotent bezeichnet. Im Gegensatz dazu besitzen adulte Stammzellen ein limitiertes Differenzierungspotential und bilden die Grundlage eines spezifischen Organsystems. Die oben erwähnten Schlüsseleigenschaften adulter Stammzellen ermöglichen es ihnen, unter Erhaltung der morphologischen und funktionellen Gewebestruktur ausdifferenzierte Zellpopulationen zu regenerieren sowie Gewebsschäden im Organismus zu reparieren<sup>19</sup>.

Angesichts des beachtlichen Proliferationspotentials der Stammzellen ist eine strenge Regulation ihrer Zellteilung von Nöten, um unkontrolliertes tumorartiges Wachstum zu verhindern. Die Proliferationsmechanismen der Stammzellen müssen einerseits die Notwendigkeit zur Selbsterneuerung der Stammzellpopulation berücksichtigen, andererseits die stetige Nachfrage nach kurzlebigen differenzierten Zellen befriedigen. Eine Methode zur Ausbalancierung des heiklen Gleichgewichts zwischen Selbsterneuerung und Vermehrung stellt hierbei die *asymmetrische Zellteilung* dar. Das Konzept der asymmetrischen Teilung beruht darauf, dass eine Stammzelle sowohl eine differenzierte Tochterzelle als auch eine Tochterstammzelle hervorbringt und auf diese Weise den Stammzellpool konstant hält. Hierbei werden kurzlebige Vorläuferzellen als direkte Nachkommen der Stammzellen angenommen, die ein begrenztes Vermehrungspotential besitzen und sich daher nur über einen relativ kurzen Zeitraum

teilen, um die Hauptmasse der spezialisierten, endgültig differenzierten Gewebszellen hervorzubringen<sup>69</sup>. Der heterogene Gewebeaufbau praktisch aller Organe resultiert aus diesem Mechanismus der Selbsterhaltung und Differenzierung. Dies gilt ebenfalls für den Gastrointestinaltrakt, dessen Epithel einen speziellen morphologischen und funktionellen Aufbau aufweist (siehe Abschnitt 1.1.2).

Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften wurden erstmals 1961 von Till und McCulloch im Knochenmark entdeckt<sup>112</sup>. Der komplexe hierarchische Aufbau des hämatopoetischen Systems aus Stammzellen, Vorläuferzellen bis hin zu spezifisch differenzierten Zellen ist sicher das am besten erforschte Modell adulter Stammzellen, jedoch wurden bereits für eine Vielzahl anderer Gewebe ebenfalls Kandidaten für Stammzellen beschrieben, wie z.B. im Nervensystem<sup>107</sup>, im Skelettmuskel<sup>67</sup>, der Epidermis<sup>6</sup>, der Leber<sup>37</sup> sowie im Gastrointestinaltrakt<sup>13</sup>.

### **1.1.2 Stammzellen des Gastrointestinaltrakts**

Das intestinale Epithel zeichnet sich durch einen besonderen morphologischen und funktionellen Aufbau aus, in dem die Zellproliferation und Differenzierung in streng regulierter Ordnung entlang der Krypte-Villus-Achse verläuft. Innerhalb dieses Prozesses bringen die intestinalen Stammzellen unreife, kurzlebige Vorläuferzellen hervor, die wiederum für die Entstehung reifer Zelltypen verantwortlich sind – namentlich Enterozyten, enteroendokrine Zellen, Becherzellen sowie Paneth-Zellen<sup>15,14,47</sup>. Diese differenzierten Zellen werden auf Grund des hohen Zellumsatzes des Gastrointestinaltrakts in ihrer Gesamtheit innerhalb weniger Tage erneuert. In einer kontinuierlichen Aufwärtsbewegung Richtung Villus verlieren sie ihre Fähigkeit zur Proliferation und erreichen ihren endgültigen differenzierten Phänotyp, bevor sie in das intestinale Lumen abgeschilfert werden. Die intestinalen Stammzellen hingegen verbleiben nahe des Kryptengrundes innerhalb eines schutzbietenden Milieus - der sogenannten *Stammzellnische*<sup>47</sup>.

Hierbei sind die Stammzellen eingebettet in einen Bindegewebskomplex bestehend aus Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen sowie Myofibroblasten<sup>62,83,106</sup>. Dieses spezialisierte, komplexe Milieu sezerniert Signalmoleküle, die unabdingbar für die Erhaltung der Stammzellidentität sind und im Einklang mit intrinsischen Stammzeleigenschaften das Proliferationsverhalten

regulieren<sup>62</sup>. Unter diesen Signalmolekülen finden sich Wachstumsfaktoren wie FGF (Fibroblast Growth Factor) sowie Moleküle der Signalwege Wnt, BMP und Notch<sup>18,98</sup>, die einerseits die Richtung der Zellproliferation bestimmen, andererseits die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen erhalten. Die diesem empfindliche Gleichgewicht zugrunde liegenden Mechanismen sind elementar für das Verständnis der Stammzellregulierung, jedoch auch der Deregulierung im Hinblick auf die Natur der Tumorentstehung. So führt zum Beispiel die übermäßige Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs über Myc zur Überproduktion von Stammzellen mit konsekutiver Ausbildung von Tumoren<sup>22</sup>.

Die Charakterisierung intestinaler Stammzellen gestaltete sich über lange Zeit schwierig, jedoch wurden in den letzten Jahren zwei vielversprechende Stammzellmarker intensiv erforscht – Lgr5<sup>9</sup> als Leucin-reicher G-Protein gekoppelter Rezeptor und das Onkogen Bmi-1<sup>99</sup>. Darüber hinaus sind eine Vielzahl anderer mutmaßlicher Stammzellmarker im Gespräch, wobei der erwähnenswerteste Musashi-1 (Msi1) darstellt – ein RNA-Bindungsprotein, das einen positiv regulierenden Effekt auf den Notch-Signalweg besitzt<sup>75,77,88</sup>. Mit Hilfe derartiger Marker zielt man darauf ab, intestinale Stammzellen zu isolieren, um genauere Informationen über die für eine Stammzelle spezifischen Eigenschaften sowie die Regulationsmechanismen der Selbsterneuerung und Differenzierung zu erhalten.

## 1.2 Die Tumorstammzelle

### 1.2.1 Tumor als aberrantes Organ

Analog zu normalem Gewebe setzen sich auch Tumore aus heterogenen Zellpopulationen zusammen, die in unterschiedlichen Differenzierungsstufen vorliegen. Tatsächlich sind diese Differenzierungsgrade im morphologischen und architektonischen Aufbau eines Tumors für Pathologen die Schlüsselemente, um die anatomische Herkunft eines Tumors zu bestimmen<sup>27</sup>. Ein Tumor stellt somit nicht einfach nur eine Ausbreitung monoklonaler Zellen dar, sondern kann durch seinen heterogenen Zellaufbau als aberrantes Organ bezeichnet werden. Dessen Wachstum

wird durch mutierte Tumorzellen aufrechterhalten, die mit der Fähigkeit zur unkontrollierten Selbsterneuerung und Differenzierung ausgestattet sind<sup>21,92</sup>.

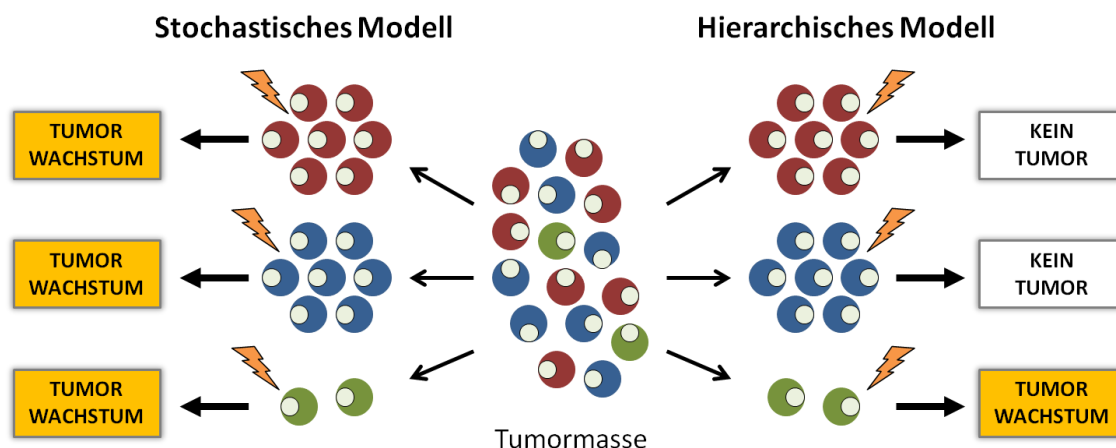
Die neoplastische Transformation einer Zelle ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem es zu einer Akkumulation von Mutationen und epigenetischen Veränderungen kommt – ein Vorgang, der sich nicht selten über mehrere Jahre hin erstreckt<sup>27</sup>. In vielen Geweben, in denen Tumore regelhaft entstehen, wie im Gastrointestinaltrakt, im hämatopoetischen System oder der Haut, haben differenzierte Zellen nur eine kurze Lebensspanne und daher eine begrenzte Wahrscheinlichkeit die multiplen Mutationen zu entwickeln, die für die Entstehung einer Neoplasie notwendig sind. Stammzellen sind besonders in Geweben mit hohem Zellumsatz die einzigen Zellen mit ausreichender Lebensdauer, um die erforderliche Anzahl an genetischen Mutationen für eine maligne Transformation zu erlangen. Zusätzlich sind Stammzellen bereits mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung ausgestattet, so dass der Erhalt dieser Aktivität einfacher erscheint und vermutlich weniger Mutationen erfordert als die *de novo* Aktivierung der Selbsterneuerungsmechanismen in bereits differenzierten Zellen<sup>92</sup>.

### **1.2.2 Modelle der Tumorentstehung**

Es werden derzeit zwei Modelle diskutiert, die die Heterogenität der Tumorzusammensetzung erklären sollen: das *stochastische* und das *hierarchische Modell*. Beide Ansätze gehen davon aus, dass nur eine geringe Anzahl an Zellen innerhalb eines Tumorverbandes die Fähigkeit besitzt, Tumorstadium zu initiieren und aufrecht zu erhalten.

Das stochastische Modell schreibt allen Tumorzellen identische biologische Eigenschaften und somit jeder einzelnen Tumorzelle das Potenzial zur Tumorgenerierung zu. Dieses Potenzial wird allerdings durch verschiedene intrinsische Faktoren, wie die Anwesenheit bestimmter Transkriptionsfaktoren und Translationsmechanismen limitiert. Weiterhin spielen verschiedene extrinsische Faktoren, wie spezifische Zytokinkonzentrationen, ein geeignetes Mikromilieu und Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle, die den Eintritt einer Tumorzelle in den entsprechenden Zellzyklus zu einem stochastisch unwahrscheinlichen Ereignis machen<sup>16,79</sup>.

Im Gegensatz dazu steht das hierarchische Modell, das oft auch als Tumorstammzellmodell bezeichnet wird<sup>102</sup>. Hierbei wird die Theorie vertreten, dass nur eine kleine Untergruppe der Tumorzellen, die sog. Tumorstammzellen biologisch dazu befähigt sind Tumorstammzellen zu generieren und aufrecht zu erhalten. Entsprechend diesem Modell geht man von einem Aufbau des Tumors analog zur Zellhierarchie im gesunden Gewebe aus. Die an der Basis stehende Tumorstammzelle produziert sowohl identische Tochterstammzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie differenzierte Tochterzellen mit limitiertem Proliferationspotenzial, die für die Ausbildung der differenzierten Haupttumormasse verantwortlich sind. Ausgehend von diesem Modell sollte es möglich sein, aus einer Tumormasse zwei Zellfraktionen zu isolieren: Zum einen die nicht-tumorigenen Zellen, die keine Veranlagung zur Tumorgenerierung besitzen, zum anderen die Tumor-induzierenden Zellen, von denen jede Einzelne zur Initiierung von neoplastischem Wachstum befähigt ist. Diese Tumorzellen zeichnen sich analog zu ihrem nicht mutierten Gegenpart – der normalen Stammzelle – durch ihr Potenzial zur Selbsterneuerung, Differenzierung und insbesondere zur unbegrenzten Proliferation aus, weswegen sie als Tumorstammzellen bezeichnet werden<sup>79,92,94</sup>.



**Abbildung 1.1 Stochastisches vs. hierarchisches Modell (adaptiert nach O'Brien et al.<sup>79</sup>)**  
Das Stochastische Modell postuliert, dass alle Zellen innerhalb eines Tumors das Potential zur Tumorgenerierung besitzen, die dazu notwendigen Mutationen jedoch mit einer stochastisch geringen Wahrscheinlichkeit eine einzelne Zelle treffen.  
Die Theorie hinter dem hierarchischen Modell besagt, dass ein Tumor eine Subpopulation an tumorinitierenden Zellen enthält, die alleinig die Fähigkeit besitzen Tumorstammzellen zu initiieren und aufrecht zu erhalten.

### 1.2.3 Entstehungsmechanismus des Kolonkarzinoms

Der Gastrointestinaltrakt zeichnet sich durch eine hohe Prävalenz an Tumorerkrankungen aus, u.a. begünstigt durch einen raschen Zellumsatz und der Exposition gegenüber toxischen Nahrungsbestandteilen. Im Kolon und Rektum verläuft die Transformation von normalem Gewebe über Dysplasien zum malignen Tumor in zahlreichen Schritten. Man geht davon aus, dass ein typischer kolorektaler Tumor mindestens 11.000 genomische Alterationen enthält<sup>108</sup>.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen parallel zur klinischen Progression von Darmtumoren zu verlaufen schien, stellten Fearon und Vogelstein 1988 die Adenom-Karzinom-Sequenz<sup>116</sup> auf, ein Modell von aufeinanderfolgenden genetischen Veränderungen, die letztendlich zur Entstehung eines Kolonkarzinoms führen<sup>33</sup> (siehe Abbildung 1.2).

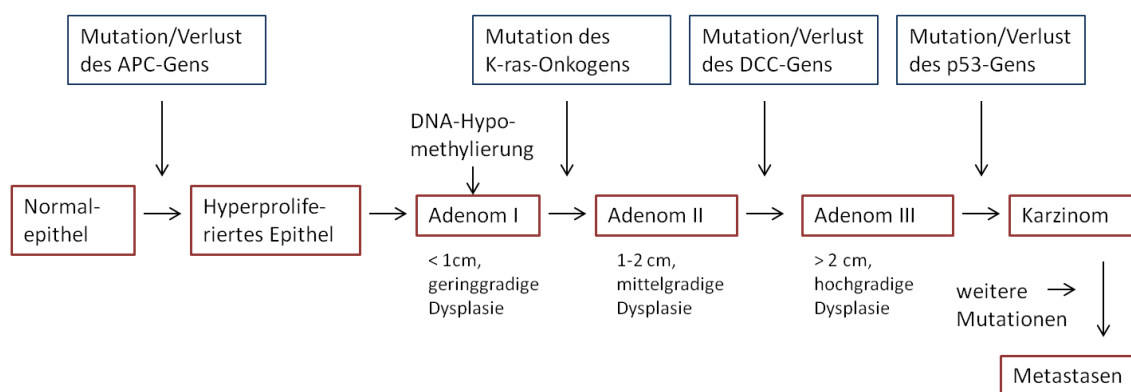
Die Erforschung der molekularen Pathogenese von FAP (familiäre adenomatöse Polyposis), einer Erbkrankheit, die unweigerlich die Entstehung von Kolonkarzinomen bedingt, führte zur Entdeckung des APC-Gens, das inzwischen als „Gatekeeper Gen“ für die Entstehung des Kolonkarzinoms gilt und die initiale Mutation der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt<sup>44</sup>. Über die Herabregulierung von  $\beta$ -catenin kontrolliert APC den Wnt-Destruktionskomplex und reguliert so die Proliferation epithelialer Zellen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Zusätzlich spielt APC eine entscheidende Rolle in der Kontrolle intrazellulärer Adhäsion, der Regulation von Apoptose, Zellzyklus-Progression und chromosomaler Instabilität. Mutationen des Gatekeeper Gens resultieren daher in einem gestörten Gleichgewicht der Zellteilung gegenüber dem Zelltod<sup>43</sup>.

Darüber hinaus führten Studien an HNPCC (hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom), einer weiteren erblichen Form des Kolonkarzinoms, zur Identifizierung alternativer Pathomechanismen in der Entstehung kolorektaler Tumore. 90% der Patienten mit HNPCC weisen Mutationen in den „mismatch“ Reparaturgenen hMSH2 und MLH1 auf, die auch als „Caretaker Gene“ bezeichnet werden. Die Inaktivierung dieses Reparatursystems führt zu einer Mikrosatelliteninstabilität, die wiederum die Akkumulation von Mutationen in Genen begünstigt, die den Fortbestand, die Proliferation und Selbsterneuerung der Zellen kontrollieren. Wichtige Vertreter



dieser Gene beinhalten K-ras, DCC, Smad4 und p53, deren Mutation zur fortschreitenden Progression des Tumors führt (siehe Abbildung 1.2).

In wie weit sich dieses klassische Modell der Tumorentstehung über die Adenom-Karzinom-Sequenz mit der Theorie der Tumorstammzellen vereinbaren lässt, muss noch geklärt werden. Jüngste Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass Tumorstammzellen oder ihre unmittelbaren Nachkommen Angriffspunkte dieser initialen Mutationen sind, was als Hinweis für die Gültigkeit des Tumorstammzellmodells angesehen werden kann<sup>105</sup>.



**Abbildung 1.2 Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz der kolorektalen Karzinogenese (adaptiert nach Fearon und Vogelstein<sup>33</sup>)**

**Mutationen im APC-Tumorsuppressorgen initiieren den Prozess der neoplastischen Entartung. Tumorprogression resultiert aus Mutationen in weiteren Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgen (z.B. K-ras, DCC und p53) und genomischer Instabilität, die im Zusammenspiel zur Entstehung eines kolorektalen Karzinoms führen.**

### 1.3 Entwicklung der Tumorstammzellforschung

Die Identifizierung von Tumorstammzellen und der darauf begründete hierarchische Aufbau eines Tumors sind von wesentlicher Bedeutung für unser Verständnis der Tumorbiologie. Die Hypothese, dass eine kleine Subpopulation der Tumorzellen für das Wachstum des Tumors verantwortlich ist, wurde erstmals bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nachgewiesen.

### 1.3.1 Tumorinitiierende Zellen im hämatopoetischen System

In den frühen '90er Jahren führten Dick et al. eine Reihe wegweisender Versuche durch, um herauszufinden, ob der hierarchische Aufbau der Hämatopoese auch in Tumoren des Blutes erhalten bliebe<sup>17,58</sup>. Es gelang ihnen in verschiedenen humanen AML-Formen eine Zellpopulation zu isolieren, die sich durch ein  $CD34^+CD38^-$ -Oberflächenprofil auszeichnete und damit phänotypisch einer normalen hämatopoetischen Stammzelle ähnelte. Obwohl sie nur ca. 0,2% der gesamten Tumormasse ausmachte, war ausschließlich diese Zellfraktion in der Lage in NOD/SCID-Mäusen (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency disease mice) Leukämie zu initiieren sowie in Serie transplantiert zu werden. Andere AML-Zellen waren selbst in großer Anzahl unfähig Leukämie herbeizuführen. Interessanterweise riefen die isolierten  $CD34^+CD38^-$ -AML-Zellen in allen Fällen das Wachstum eines heterogenen, hierarchisch aufgebauten leukämischen Tumors hervor, der morphologisch völlig identisch zum Ausgangstumor war. Somit konnte bewiesen werden konnte, dass diese Zellpopulation sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung als auch zur Selbsterneuerung besaß<sup>58</sup>. Zusammengefasst boten diese Beobachtungen den ersten experimentellen Beweis, dass die Zellpopulation eines humanen Tumors entsprechend einer funktionellen Hierarchie organisiert ist, in seiner Struktur ähnlich einem normalen Stammzellsystem<sup>27,79,105</sup>.

### 1.3.2 Tumorinitiierende Zellen in soliden Tumoren

Ein Jahrzehnt nach Entdeckung der Tumorstammzellen in AML übertrugen Al Hajj et al.<sup>2</sup> dieses Prinzip auf einen soliden Tumor. Dazu stellten sie aus Proben humaner Mammarkarzinome Einzelzellsuspensionen her und injizierten diese Zellen in das Brustfett von NOD/SCID-Mäusen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten sie unter den Brustkrebszellen eine  $CD44^+CD24^-$ -Subpopulation identifizieren, die mit 11% - 35% zwar nur einen Teil der Gesamtpopulation darstellte, jedoch als einzige Fraktion in der Lage war einen Tumor zu initiieren. Die entstanden Xenografte erwiesen sich als phänotypisch identisch zum Ursprungstumor und konnten weiterhin in Serie passagiert werden, wobei ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung ebenso bewiesen werden konnte wie ihre Fähigkeit zur Generierung nicht-tumorigener Tochterzellen<sup>2</sup>.

In den folgenden Jahren nach der Publikation dieser Brustkrebsstudie erschien eine Reihe von Artikeln, die die Existenz von Tumorstammzellen in einem breiten Spektrum solider Neoplasien untersuchte. Zu den soliden Tumoren, für die eine Subpopulation an Tumorstammzellen nachgewiesen wurde, zählen Gehirn-<sup>104</sup>, Kolon-<sup>28,80,95</sup>, Kopf- und Hals-<sup>89</sup>, Pankreas-<sup>46,61</sup>, Prostata-<sup>23</sup> und Lungentumore<sup>31</sup>, Melanome<sup>101</sup> sowie mesenchymale<sup>121</sup> und hepatische Tumore<sup>64,122</sup>.

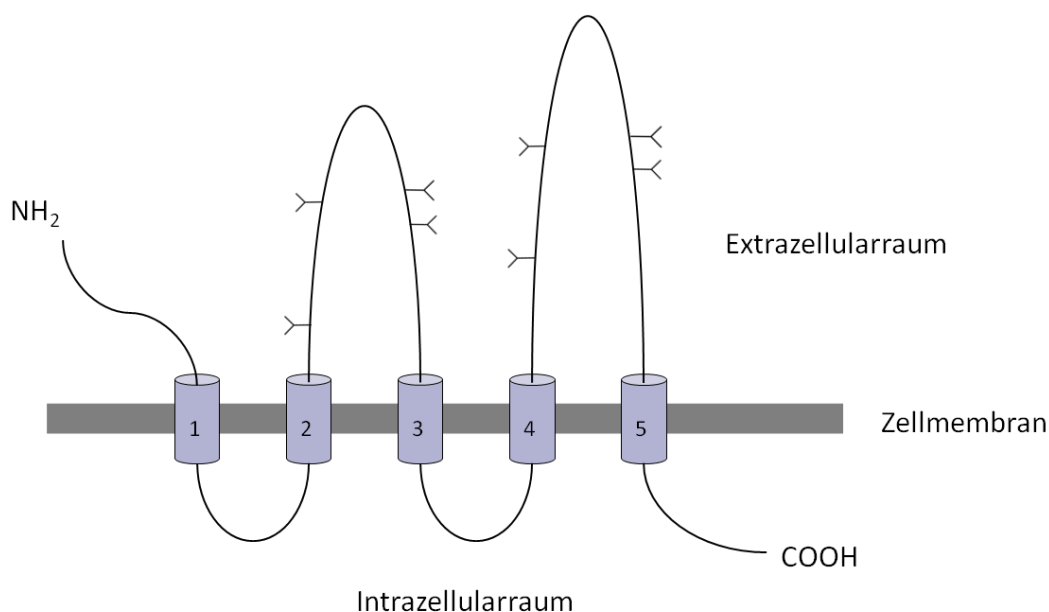
Singh et al.<sup>104</sup> identifizierten im Jahre 2004 Tumorstammzellen in humanen Medulla- und Glioblastomen, die sich durch den Oberflächenmarker CD133 auszeichneten. Nach Injektion in NOD/SCID-Mäuse riefen allein die CD133<sup>+</sup>-Zellen Tumorstammzellen hervor, wobei bereits eine so geringe Anzahl wie 100 Zellen ausreichte um ein Tumorstammzellengraft hervorzubringen, das phänotypisch und histologisch völlig identisch zum Ursprungstumor war. Im Gegensatz dazu konnte selbst die Injektion von 100.000 CD133<sup>-</sup>-Zellen kein Tumorstammzellen auslösen. Zudem konnten lebensfähige CD133<sup>-</sup>-Gehirntumorstammzellen noch lange nach der Transplantation nachgewiesen werden, was für die Annahme spricht, dass ihr Wachstum sehr wohl durch die Mikroumgebung unterstützt wurde, sie allerdings schlicht nicht die Kapazität zur Tumorstammzellengenerierung besaßen. Die aus CD133<sup>+</sup>-Zellen entstandenen Xenografte konnten, wie schon beim Mammakarzinom beschrieben, in Reihe transplantiert werden, wodurch sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bewiesen, eine wichtige Grundlage der Tumorstammzellbiologie<sup>104</sup>.

Seit der erstmaligen Veröffentlichung dieser Studie zu Gehirntumoren wurde die Rolle des Oberflächenantigens CD133 als Tumorstammzellmarker für eine Vielzahl anderer Tumore erforscht, darunter Kolon-<sup>28,80,95</sup>, Pankreas-<sup>46</sup> und Lungenkarzinome<sup>31</sup>. Unter Verwendung ähnlicher Mausmodelle wie das für Gehirntumore beschriebene gelang es einigen Gruppen zu zeigen, dass die Kapazität Tumorstammzellen zu initiieren in der Population CD133<sup>+</sup>-Zellen deutlich angereichert war im Vergleich zur entsprechenden CD133<sup>-</sup>-Subgruppe. In diesem Zusammenhang ist es wichtig anzumerken, dass CD133 zwar vermehrt als Marker auf Tumorstammzellen vorkommen kann, jedoch niemand bis jetzt bewiesen hat, dass jede CD133<sup>+</sup>-Zelle auch eine Tumorstammzelle repräsentiert<sup>79,105</sup>.

## 1.4 Das Oberflächenprotein CD133

Da CD133 als vielversprechendster Marker für Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms identifiziert worden war, konzentrierten wir uns in der primären Identifizierung potentieller Tumorstammzellen auf diesen Oberflächenmarker.

CD133, auch als Prominin-1 bezeichnet, ist ein Glykoprotein mit fünf transmembranären Domänen und wurde ursprünglich sowohl beim Menschen als auch bei der Maus als Oberflächenmarker primitiver CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer und neuraler Stammzellen beschrieben<sup>73,79</sup>. Da die Expression der CD133 Moleküle zusätzlich hochspezifisch für Ausstülpungen (Mikrovilli, Stereozilien) von Plasmamembranen epithelialer Zellen und anderer Zellarten in Verbindung mit Membrancholesterol ist, wird in letzter Zeit auch davon ausgegangen, dass sie eine Rolle beim Aufbau der Plasmamembranstruktur spielen.



**Abbildung 1.3 Molekularer Aufbau des Oberflächenproteins CD133**  
(adaptiert nach Miraglia et al.<sup>72</sup>)

Im Jahre 1997 gelang es Yin et al. den monoklonalen Antikörper MAb AC133 herzustellen, der spezifisch an AC133 bindet, ein glykosylierungsabhängiges Epitop des Antigens CD133<sup>122</sup>. Da in diesen ersten Versuchen die Expression von AC133 auf CD34<sup>+</sup>-Vorläuferpopulationen von adulten Blut- und Knochenmarkszellen sowie fetalen Leberzellen beschränkt schien, wies dies auf seine Funktion als Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen hin<sup>123</sup>. Im Zuge der weiteren molekularbiologischen Aufarbeitung der cDNA (complementary DNA) von AC133 wurde das Molekül als polypeptidischer Einzelstrang aufgebaut aus 865 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 120 kD charakterisiert. Das Molekül besteht aus fünf Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischem C-Terminus sowie zwei extrazellulären Schleifen mit acht N-Glykosylierungsstellen<sup>72</sup> (siehe Abbildung 1.3).

Im selben Jahr entwickelten Weigmann et al. den murinen monoklonalen Antikörper MAb 13A4 und beschrieben sein korrespondierendes Antigen als Prominin, ein Glykoprotein aus 858 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 115 kD mit strukturell analogem Aufbau zu AC133. Prominin fand sich angereichert in den apikalen Mikrovilli von embryonalem und adultem Neuroepithel der Mäuse sowie den mikrovillären Spitzen der Bürstenzellen der Niere<sup>117</sup>.

Die Strukturähnlichkeiten von humanem AC133 und murinem Prominin deuteten darauf hin, dass sich diese beiden Proteine homolog zu einander verhalten, auch wenn ihre Aminosäuresequenz und ihre Gewebeverteilung in gewissem Grade verschieden zu sein schienen<sup>25,71</sup>. Im Einklang mit der Funktion von AC133 als Marker hämatopoetischer Stammzellen wird jedoch auch Prominin von gut einem Drittel der CD34<sup>+</sup>-Zellen des murinen Knochenmarks präsentiert<sup>24</sup>, während in weiteren Versuchen zudem die Präsenz von AC133 in den apikalen Membranmikrovilli einer humanen epithelialen Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Die Spezifität des MAb AC133 ist darüber hinaus von der Glykosylierungsstruktur des Oberflächenmarkers abhängig, die sich im Rahmen der Zelldifferenzierung und/oder malignen Transformation verändert<sup>24</sup>. Florek et al. gelang es in diesem Zusammenhang einen Antikörper zu entwickeln, der humanes CD133 unabhängig vom Glykosylierungsstatus erkannte und ein ähnliches Expressionsmuster wie Prominin nachweisen konnte. Das humane Antigen CD133 beweist demnach dieselben Schlüsselqualitäten, die zuvor für murines Prominin beschrieben wurden, was als überzeugender Beweis für die Homologität beider

Antigene angesehen wird und eine vergleichende Verwendung der beiden Antikörper rechtfertigt<sup>36</sup>.

Nachdem CD133 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen identifiziert wurde, richteten sich die Untersuchungen nun auch auf sein Potenzial als Oberflächenmarker von Progenitorzellen solider Organe sowie adulter Stammzellen. Zusätzlich zum hämatopoetischen System werden CD133 und CD34 auch auf endothelialen Vorläuferzellen exprimiert, die eine Rolle bei der Angiogenese und Neovaskularisierung sowohl bei der Wundheilung als auch beim Tumorwachstum spielen<sup>50,93</sup>. Florek et al. gelang es zu zeigen, dass die Expression von CD133 nicht allein auf Stamm- und Vorläuferzellen beschränkt ist, sondern auch auf der Oberfläche differenzierter Zellen nachgewiesen werden kann. Sie beschrieben das Epitop AC133 zusätzlich als hilfreichen Marker zur Tumorcharakterisierung<sup>36</sup>. Wie oben bereits beschrieben, existieren inzwischen zahlreiche Veröffentlichungen, die die Bedeutung von CD133 als Tumorstammzellmarker untermauern.

## **1.5 Die Zelllinie CT26**

Die Zelllinie CT26 wurde auf Grund ihrer hoch exponentiellen Wachstumsrate und ihrer potenten Fähigkeit zur Tumorinitiierung ausgewählt. Mit ihrem Ursprung in einem murinen Kolonkarzinom erschien sie ideal, um die Hypothese der Tumorstammzellen im Kolonkarzinom primär an einer etablierten Zelllinie untersuchen zu können. Bei der Zelllinie handelt es sich um ein undifferenziertes Adenokarzinom des Kolons der Balb/c-Maus, welches adhärent wächst. Diese Zellen wurden zur Tumorinduktion in den Versuchstieren benutzt, wozu ihre Injektion subkutan erfolgte<sup>26</sup>.

Ihren Ursprung hatte die Zelllinie CT26 im Jahre 1975, als es Corbett et al. gelang durch intrarektale Injektion von N-Nitroso-N-Methylurethan (NMU) in Balb/c-Mäusen ein Kolonkarzinom zu induzieren, das seriell transplantiert werden konnte und über eine extrem schnelle Wachstumsrate verfügte. Entsprechend der laufenden Nummern der 82 Versuchstumore wurde die Zelllinie schlicht mit der Nummer 26 betitelt, die Abkürzung CT steht hierbei für Kolontumor<sup>26</sup>.

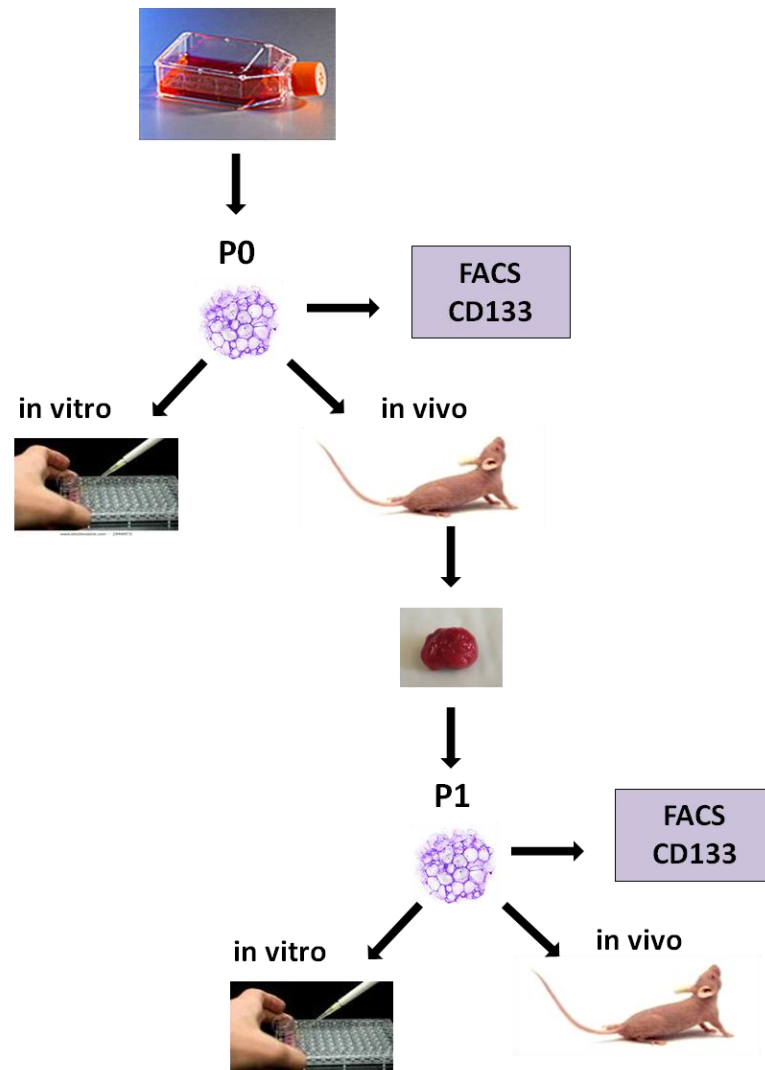
## 1.6 Fragestellung

### Hypothese:

Die murine Kolonkarzinomlinie CT26 enthält eine bestimmte CD133-positive Subpopulation, die durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt ist. Diese Zellen besitzen weiterhin eine vorrangige Expression von Stammzeleigenschaften, wodurch sie im Gegensatz zur Haupttumormasse resistenter gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung sind.

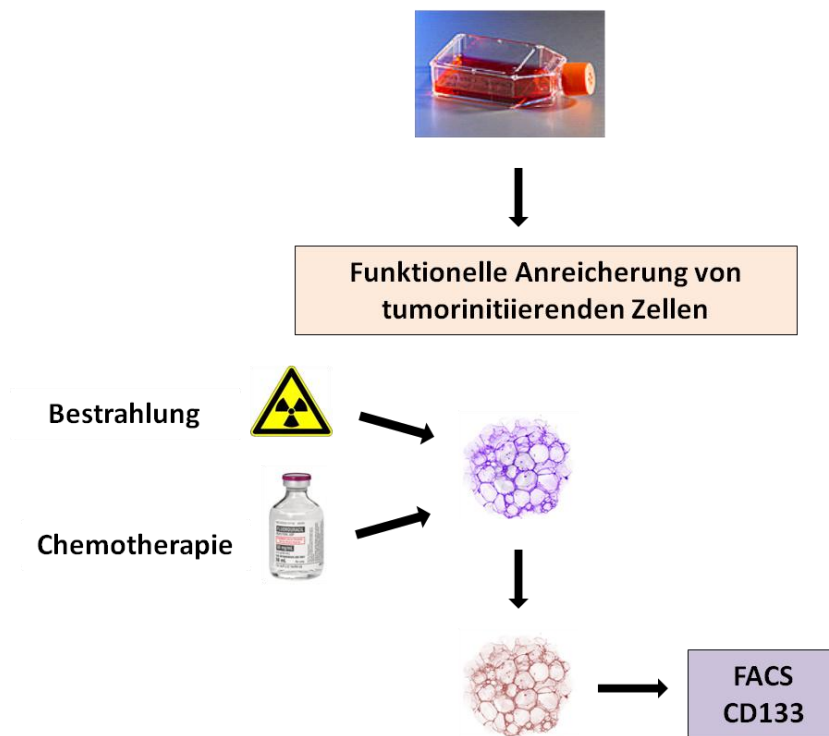
### Versuche:

1. Analyse der Zelllinie CT26 auf die Expression des Oberflächenmarkers CD133:
  - Bestimmung des Prozentsatzes CD133-positiver Zellen in vitro und in vivo.
2. Untersuchung des Proliferationspotentials der Zelllinie CT26 in vitro:
  - Bestimmung des Zellanteils, der zur Proliferation und Bildung von Zellkolonien fähig ist.
3. Subkutane Implantation der Zelllinie CT26 in Nacktmäuse:
  - Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Tumore in vivo.
4. Injektion verschieden hoher Konzentrationen der Zelllinie CT26 in Nacktmäuse (P0) sowie weiterführende Injektion der Tumorzellen in Zweitempfängermäuse (P1):
  - Vergleich von Wachstumsverhalten und Phänotyp entsprechender Tumorreihen.
5. Funktionelle Anreicherung der tumorinduzierenden Zellen durch Bestrahlung und durch Chemotherapie.



**Abbildung 1.4 Schema zum Versuchsaufbau 1 bis 4:**  
**Bestimmung des Anteils CD133<sup>+</sup>-Zellen in vitro und in vivo**  
**Untersuchung des Proliferationsverhaltens der CT26-Zellen in vitro und in vivo**





**Abbildung 1.5 Schema zum Versuchsaufbau 5:**  
**Funktionelle Anreicherung tumorinduzierender Zellen durch Bestrahlung und Chemotherapie.**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Cryo-Tubes.....	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläser.....	Hartenstein, Würzburg
Einmal-Injektions-Kanülen Microlance 3™ (27G).....	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG) 1 ml, 1,5 ml.....	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen.....	Becton Dickinson, Heidelberg
Faden - Vicryl (6,0).....	Ethicon, Norderstedt
Falcon 15 ml, 50 ml.....	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen.....	Corning, Amsterdam, NL
MACS-Magnet.....	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Säule (LS).....	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Microtiterplatten, 96 Vertiefungen.....	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischale.....	Corning, Amsterdam, NL
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml.....	Corning, Amsterdam, NL
Skalpell.....	Feather, Osaka, Japan
Spritze Plastipak™ 1 ml.....	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze Discardit™ 3 ml, 5 ml, 10 ml.....	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter.....	Millipore, Schwalbach
6-Well-Platten.....	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> .....	Corning, Amsterdam, NL
Zellschaber.....	Corning, Amsterdam, NL
Zellsiebe 40 µm, 70 µm, 100 µm.....	Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.2 Chemikalien

BSA (Bovines Serumalbumin).....	Biomol, Hamburg
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid).....	Merck, Darmstadt
CFSE (5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester).....	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid).....	Sigma, Steinheim
FCS (fötales Kälberserum).....	Biochrom, Berlin
5-Fluorouracil.....	Oncosachs, Leipzig
Hepes.....	Gibco, Karlsruhe
Ketamin.....	Inresa, Freiburg
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumbicarbonat).....	Merck, Darmstadt
Kollagenase 5% (Clostridium histolyticum).....	Sigma, Steinheim
L-Glutamin.....	Biochrom, Berlin
NaCl (Natriumchlorid) 0,9%.....	Braun, Melsungen
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid).....	Sigma, Steinheim
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid).....	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco.....	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin.....	Biochrom, Berlin
PI (Propidiumjodid).....	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 Medium (-) L-Glutamine.....	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau 0,5%.....	Biochrom, Berlin
Trypsin 0,05%.....	Gibco, Karlsruhe
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit.....	Invitrogen, Karlsruhe
Xylazin 2%.....	Cp-pharma, Burgdorf

### **2.1.3 Zusammensetzung der Puffer, Lösungen und Medien**

#### **FACS-Puffer**

- 5 g BSA
- 1 g Natrium Azid
- 1 L PBS

#### **MACS-Puffer**

- 0,74 g EDTA
- 5 g BSA
- 1 L PBS

#### **Humanes Kulturmedium**

- RPMI 1640 DMEM
- 75 ml FCS (15%)
- 5 ml P/S (Penicillin/Streptomycin) (1%)
- 5 ml Hepes (1%)

#### **Erylyselösung**

- 8,3 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1,09 g  $\text{KHCO}_3$
- 10 ml 1% EDTA
- 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  bidest

#### **Einfriermedium**

- 10% DMSO
- 30% FCS
- 40% RPMI 1640-Medium

**Kollagenase 5 %**

- 0,5 g Kollagenase (*Clostridium histolyticum*)
- in 9,5 ml PBS resuspendieren, steril filtrieren

**Kollagenaselösung**

- 25 ml Kulturmedium (RPMI 1640, P/S, FCS, Hepes)
- 2,5 ml 5 % Kollagenase (10%)
- 5 ml CaCl<sub>2</sub>

**Narkoselösung**

1 ml Spritze:

- 0,1 ml 2% Xylazin
- 0,8 ml Ketamin
- 0,1 ml 0,9% NaCl

**2.1.4 Antikörper und Sekundärreagenzien**

Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper und Sekundärreagenzien

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
<b>CD11b-bio</b>	M1/70	Rat IgG2b	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
<b>CD133-PE</b>	13A4	Rat IgG1	Natutec, Frankfurt/Main
<b>Isotyp</b>			Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
<b>RatIgG1-PE</b>			
<b>CD44-APC</b>		Rat IgG2b	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
<b>CD3-FITC</b>	145-2C11	Armenian hamster IgG1	eBioscience, San Diego, USA

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD45.1-PE	A20	Mouse IgG2a	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fc-Block (CD16/CD32 AK)			Invitrogen, Carlsbad, USA
SA-APC			eBioscience, San Diego, USA
$\alpha$ -PE mikro beads			Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tabelle 2.2 Konzentrationen der verwendeten Antikörper und Sekundärreagenzien

Spezifität	Verdünnung
CD11b-bio	1:100
CD133-PE	1:20
Isotyp	1:20
RatIgG1-PE	
CD44-APC	1:100
CD3-FITC	1:100
CD45.1-PE	1:100
SA-APC	1:200
Fc-Block	1:100

## **2.2 Labormethoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Für die Zellkultur wurde die murine Zelllinie CT26 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein durch N-Nitroso-N-Methylurethan (NMU) induziertes undifferenziertes Adenokarzinom des Kolons der Balb/c-Maus. Die Zelllinie entstammt der Kultur der AG Geissler, Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg.

Die Zellen wurden in RPMI-Kulturmedium unter Zugabe von 15% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES unter Standardbedingungen im Wärmeschrank bei 37°C kultiviert, dabei alle 2 – 3 Tage ein Mediumswechsel durchgeführt.

#### **2.2.1.1 Auftauen der Zellen**

Die auf -80°C tiefgefrorenen Zellen wurden im Wärmebad bei 37°C vorsichtig aufgetaut. Um eine größere Reinheit der Zellen zu erhalten, wurden diese mit 1 ml FCS resuspendiert und in einen mit 15 ml humanem Kulturmedium gefüllten Falcon überführt, für 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt. In eine T25 Kulturflasche (entspricht 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) wurden 5 ml Medium sowie zusätzlich 0,5 ml FCS vorgelegt, daraufhin die in 1 ml RPMI-Medium resuspendierten Zellen in die Kulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.2 Zellkultur**

Zu Beginn der Aussaat wurden 500.000 frisch aufgetaute oder zuvor in Einzelzellsuspension gebrachte CT26-Zellen in eine T25-Kulturflasche gegeben und diese mit ca. 3 ml humanem Medium auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Zur Inkubation bei 37°C wurde die Zellkultur liegend im Wärmeschrank aufbewahrt und in der ersten Woche täglich, danach alle 2 bis 3 Tage ein Mediumswechsel durchgeführt. Hierbei wurde zuerst das Kulturmedium mit einer dünnen Glaspipette abgesaugt, daraufhin die Zellen mit ca. 10 ml PBS gespült, um abgestorbene, nicht adhärente Zellen und etwaige Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden 0,5 – 1,5 ml 0,05% Trypsin (entsprechend der Flaschengröße T25, T75, T175) zugegeben, die Lösung etwa ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur oder im Wärmeschrank

inkubiert, und die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Nun wurden 10 ml Kulturmedium zugegeben, um mit dem enthaltenen FCS die Trypsinierungsreaktion zu stoppen, schließlich die Bodenfläche der Kulturflasche gründlich abgespült und die Zellsuspension in eine Kulturflasche mit bereits vorgelegtem Medium überführt.

#### **2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl durch Färbung mit Trypanblau**

Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension steril entnommen und in 90 µl Trypanblau gut resuspendiert, anschließend in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen lichtmikroskopisch in allen vier Quadranten ausgezählt. Zur Berechnung der Zellen pro ml wurde die ausgezählte Zellzahl erst durch vier geteilt, um die Zellzahl in einem Quadranten zu erhalten. Zum Ausgleich der Verdünnung (1/10) wurde das Ergebnis mit 10 multipliziert. Da das Volumen in einem Quadranten 1/10 µl beträgt, musste nun noch mit 10.000 multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

#### **2.2.1.4 Einfrieren der Zellen**

Zur Konservierung wurden die Zellen zuerst wie unter Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben abtrypsinisiert, in 10 ml des Kulturmediums aufgenommen und in einen 15 ml Falcontube überführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml des Einfriermediums (siehe Abschnitt 2.1.3, 40% Kulturmedium, 30% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und die Zellzahl durch Färbung mit Trypanblau bestimmt. Pro  $2 \times 10^6$  Zellen wurde nun 1 ml des Einfriermediums zugegeben und die Zelllösung vorsichtig resuspendiert, um das Überleben möglichst vieler Zellen zu sichern. In die bereits auf Eis vorgekühlten Kryoröhrchen wurde nun jeweils 1 ml der Zelllösung pipettiert, diese erst für 2 h bei -20°C eingefroren und schließlich bei -80°C in der Gefriertruhe aufbewahrt.

### **2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus solidem Tumor**

Nach Entnahme aus dem Versuchstier wurde der Tumor zuerst mit einem Skalpell von Fett- und nekrotischem Gewebe befreit, danach in eine Petrischale mit Kulturmedium gegeben um ein Austrocknen des Tumors zu verhindern. Anschließend wurde der Tumor mit einem Skalpell in kleine Stückchen von circa 5 mm Kantenlänge geschnitten und diese in eine frische Petrischale mit Kollagenaselösung (siehe Abschnitt 2.1.3,



25 ml Kulturmedium, 2,5 ml Kollagenase 5 %, 5 ml  $\text{CaCl}_2$ ) überführt. Die Lösung inkubierte anschließend für 3 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank, um eine möglichst vollständige Auflösung des Gewebeverbandes zu erreichen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen der Kollagenaselösung mit Hilfe eines 5 ml Spritzenstempels durch ein 70 oder 100 µm feines Zellsieb in eine Petrischale mit Kulturmedium gestrichen. Um eine möglichst reine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen ein zweites Mal über ein Zellsieb in einen Falconröhrchen auf Eis filtriert. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und ein weiteres Mal mit frischem Medium gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in etwa 2 ml Medium resuspendiert und die Anzahl der Zellen in Trypanblau gezählt.

### **2.2.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe (*Limiting Dilution Assay*)**

Hierbei sollte untersucht werden, wie viele Zellen der CT26-Kultur benötigt werden, um in vitro Zellklone zu bilden.

P0:

In einer 96-Well-Platte wurden vier Reihen an CT26-Zellen aus der Zellkultur in folgender absteigender Verdünnung ausgesät (siehe Abbildung 2.1):

2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – 64 – 32 – 16 – 8 – 4 – 2 – 1 Zellen.

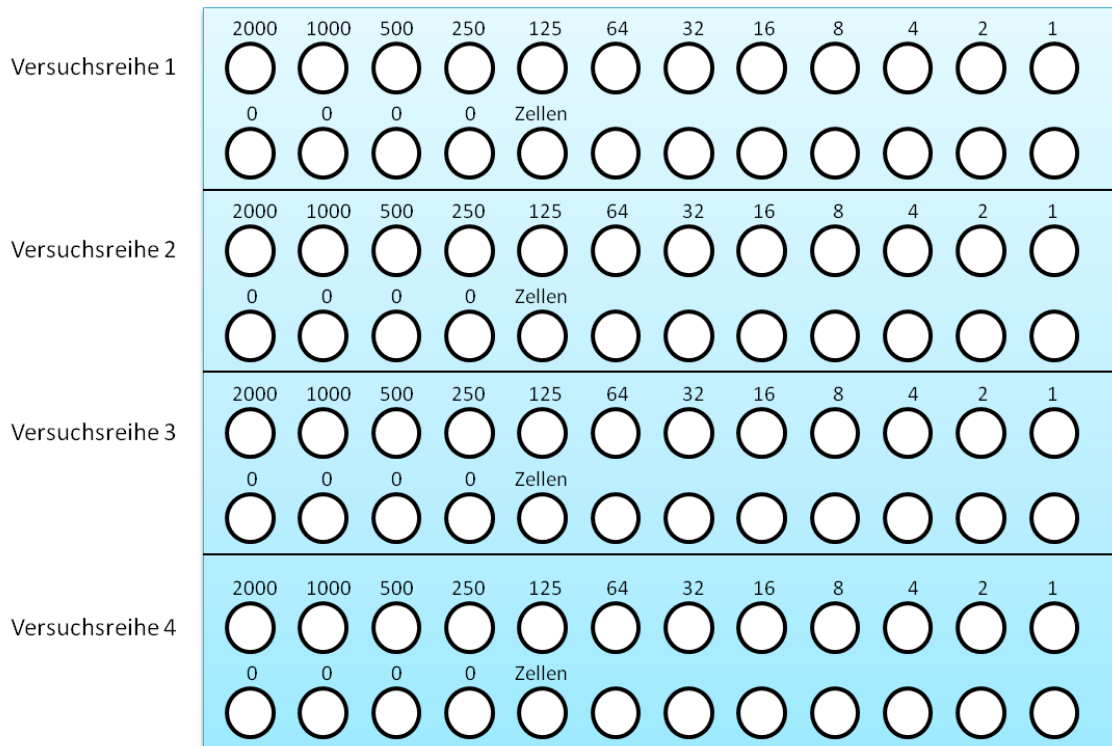
Nach 7 Tagen Inkubation im Wärmeschrank ohne Mediumswechsel wurde das Wachstum mikroskopisch dokumentiert und daraus die Frequenz der tumorinitiiierenden Zellen berechnet.

P1:

Wiederum wurden in einer 96-Well-Platte vier Reihen an CT26-Zellen, diesmal aus einem in Einzelzellsuspension gebrachten Tumor der Nacktmaus, in folgender absteigender Verdünnung ausgesät (siehe Abbildung 2.1):

2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – 64 – 32 – 16 – 8 – 4 – 2 – 1 Zellen.

Nach 7 Tagen wurde wiederum das Wachstum mikroskopisch dokumentiert und daraus die Frequenz der tumorinitiiierenden Zellen berechnet.



**Abbildung 2.1 Schema zur Aussaat der Zellen für die Verdünnungsreihe in vitro**

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Immunfärbemethode zur Detektion von Zelloberflächenmolekülen mittels monoklonaler Antikörper. Die Antikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugiert, welche bei Anregung durch einen Laser Licht definierter Wellenlänge emittieren. Bei der FACS-Messung passiert jede Zelle einer Einzelzellsuspension einen Laserstrahl. Das Licht wird durch die Zellen teils absorbiert und teils gestreut, die Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper werden durch den Laser zum Leuchten angeregt. Fotodetektoren messen einerseits das gestreute Licht, wodurch die Größe und Granularität der Zellen ermittelt werden kann. Andererseits wird auch das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht gemessen, wodurch qualitative sowie semiquantitative Aussagen über die durch die Antikörper markierten Oberflächenmoleküle der Zelle gemacht werden können.

Die Zellgröße korreliert mit der Streuung parallel zum Laserstrahl, welche durch den so genannten „forward scatter“ (FSC) gemessen wird, die Granularität korreliert mit der

Streuung rechtwinklig zum Laserstrahl, die mit dem so genannten „side scatter“ (SSC) erfasst wird. Das durch FITC und PE emittierte Licht wird mit der ersten (FL1) bzw. zweiten Fluoreszenz (FL2) des Durchflusszytometers gemessen. Die Messung wird üblicherweise durch eine „Punktewolke“ (sog. Dotplot) dargestellt. Dabei werden je zwei Eigenschaften gegeneinander aufgetragen (z.B. Granularität - SSC gegen Größe - FSC) und verglichen. Bei der Fluoreszenzmessung kann die Zahl der bindenden Antikörper pro Zelle anhand der gemessenen Leuchtstärke semiquantitativ abgeschätzt werden.

#### **2.2.4.1 Antikörper-Färbung für die Durchflusszytometrie**

In der vorliegenden Arbeit wurde sie vorwiegend zur Identifikation von CD133<sup>+</sup>-Zellen der Tumorzelllinie CT26 genutzt. Die aus Tumorgewebe aufgereinigten oder der Zellkultur entnommen Zellen wurden nach einem initialen Waschschrift in FACS-Puffer aufgenommen und je ca. 500 000 Zellen auf die FACS-Röhrchen verteilt. Nach einem weiteren Waschschrift für 2 min bei 1200 rpm und 4°C wurde Fc-Block (CD16/CD32 AK) in der Verdünnung 1:100 zugegeben, um unspezifische Bindungen zu verhindern, die Lösung daraufhin für 15 – 20 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde erneut ein Waschschrift mit FACS-Puffer durchgeführt und der PE-konjugierte Antikörper CD133 bzw. der entsprechende Isotyp Rat IgG1 in der Verdünnung 1:20 (5 µl CD133 auf 100 µl FACS-Puffer) zugegeben. Nach einer zwanzigminütigen Inkubationszeit im Kühlschrank bei 4°C wurde der Überstand für 2 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert, die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und abschließend die Röhrchen mit 400 µl FACS-Puffer für die Messung aufgefüllt. Zur Analyse der Zellen wurde ein FACSCalibur Durchflusszytometer von Becton-Dickinson verwendet.

#### **2.2.4.2 Auswertung der Ergebnisse**

Die generierten Daten wurden mit der FlowJo-Version 7.2.5 ausgewertet, wobei zunächst Zellgröße und Granularität in einem Streudiagramm dargestellt wurde. Im FFC SSC Fenster wurden die Tumorzellen definiert, während Zellreste, Aggregate, etc. außerhalb der Zellpopulation lagen und durch ein Gate ausgeschlossen wurden. Für einzelne Subpopulationen, wie CD133-positive Zellen, wurden separate Gates definiert. Das Programm ermöglichte auch die Berechnung des prozentualen Anteils der

Subpopulationen an der Gesamtzellzahl. Ein Beispiel der oberhalb beschriebenen Darstellung der Durchflusszytometrie zeigt Abbildung 3.1.

### **2.2.5 CFSE-Färbung**

Um die Zellteilungsrate mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen, wurden frisch isolierte Tumorzellen mit 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE) markiert. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit großer Genauigkeit zwischen den Tochterzellen aufgeteilt wird und es dadurch erlaubt, jede neue Generation von Tochterzellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren. CFSE ist in seiner ursprünglichen Form membranpermeabel und nicht fluoreszierend. Nach Diffusion in die Zelle wird es so verändert, dass das Molekül stark fluoresziert und die Zellmembranen nicht länger durchdringen kann. Zusätzlich bindet CFSE stabil an intrazelluläre Proteine. Proteine mit langer Halbwertszeit, wie z.B. die des Zytoskeletts, sind für die lange Haltbarkeit der CFSE-Färbung verantwortlich.

Die CFSE-Färbung wurde mit dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit durchgeführt. Zur Herstellung der Stock Solution wurden 90 µl DMSO auf 1 Röhrchen CFDA SE gegeben. Aus der Stock Solution konnte durch Zufügen von 1710 µl PBS anschließend die Working Solution hergestellt werden (Verdünnung 1:20).

Die CT26-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben abtrypsinisiert und die Zellzahl durch Färbung mit Trypanblau bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin drei Mal mit PBS bzw. Medium ohne FCS (dies stört die Färbung) für 8 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur gewaschen, anschließend der Überstand verworfen und die Zellen als Pellet belassen. Pro  $10^6$  Zellen wurden 0,5 µl der Working Solution sowie 0,05 ml PBS, beides auf Raumtemperatur erwärmt, auf das Pellet gegeben, gründlich resuspendiert und 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Weiterhin wurde FCS in einer Endkonzentration von 10% beigelegt, die Lösung 1 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie zwei Mal mit RPMI-Medium + FCS wieder für 8 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur gewaschen. Als weiterer Schritt wurden 5 ml RPMI-Medium + FCS zugegeben, 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und ein letzter Waschschriff mit RPMI-Medium + FCS durchgeführt. Zum Schluss wurden die Zellen gezählt und je 2,5 Mio Zellen in fünf T25 Kulturflaschen überführt. Vier Kulturflaschen wurden zur

Inkubation im Brutschrank aufbewahrt, eine zur Kontrolle im Kühlschrank. Die mikroskopische und durchflusszytometrische Auswertung erfolgte nach 3 Tagen.

### **2.2.6 Radiatio und Chemotherapie mit 5-FU**

Es erfolgte eine Bestrahlung der CT26-Zellen über 0s, 10s, 30s, 60s und 180s an der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg. Dies entsprach einer Bestrahlungsintensität von respektive 0 Gy, 0,9 Gy, 2,7 Gy, 5,4 Gy und 16,3 Gy. Je 500.000 Zellen der jeweiligen Gruppen wurden in fünf 6-Well-Platten für 7 Tage ohne Mediumswechsel kultiviert und anschließend die Zellzahl vergleichend bestimmt. Fünf 6-Well-Platten wurden zudem mit je 500.000 CT26-Zellen befüllt, daraufhin pro Platte 5-Fluorouracil (5-FU) in den Konzentrationen 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M hinzugefügt. Die Auswertung des Zellverhaltens erfolgte nach 7 Tagen in Kultur ohne Mediumswechsel. Für beide Versuchsansätze wurde der Prozentsatz der überlebenden Zellen durch eine PI-Färbung sowie der Anteil der CD133<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

### **2.2.7 Herstellung von sphärischen Kulturen**

Um herauszufinden, ob die CT26-Zelllinie zur Bildung von Kolosphären in der Lage sei, einem dreidimensionalen multizellulärem Tumormodell, das direkt aus frisch in Kultur gebrachten Zellen eines Kolonkarzinoms entsteht, wurden die Zellen mit einem FCS freien Medium kultiviert. Zusätzlich zu 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin wurden 20 ng/ml EGF sowie 10 ng/ml FGF-2 beigefügt. In 6 Well-Platten wurden nun jeweils drei Mal  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Zelle der CT26-Zelllinie aus der Zellkultur als P0-Probe in 3 ml des oben beschriebenen Mediums ausgesät. Desweiteren wurden ebenfalls drei Mal  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Zelle, die aus einem CT26-Tumor der Nacktmaus isolierte wurden, wiederum in 6 Well-Platten mit 3 ml des oben beschrieben Mediums als P1-Probe ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde über 14 Tage ohne Mediumswechsel mikroskopisch beobachtet.

## 2.3 Versuche am Mausmodell

### 2.3.1 Versuchstiere

Die verwendeten NMRI (Herkunftslabor: Naval Medical Research Institute) Nacktmäuse wurden aus der Zucht der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg (Tierexperimenteller Leiter: Prof. Dr. Spruss) bezogen, wobei es sich um Auszuchtstämme handelte. Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Regensburgs gehalten und wogen bei Beginn der Versuche zwischen 22 g und 38 g. Drei Mal pro Woche erfolgte ein Monitoring der Tiere, wobei ihr Gesundheitszustand optisch beurteilt, das Gewicht im Verlauf festgehalten sowie etwaiges Tumorwachstum mit einer Schieblehre vermessen wurde.

Das defiziente Immunsystem der Nacktmäuse erforderte besondere Bedingungen bei der Haltung der Tiere. So waren neben einer speziellen Nahrung eine staubfreie Einstreu in möglichst keimfreier Umgebung (Laminar-Flow-Käfige), Temperaturen um 25°C und eine Luftfeuchtigkeit von 65% zur Haltung der Tiere notwendig<sup>38</sup>.



**Abbildung 2.2 NMRI-Nacktmaus mit deutlichem Tumorwachstum an der rechten Flanke**

Die Nacktmäuse zeichnen sich durch eine spontane Mutation im FOXP1-Gen aus, welche zum Fehlen des Thymus führt. Hieraus ergibt sich einerseits das Ausbleiben der Körperbehaarung, vor allem aber eine starke Verringerung der Anzahl der T-Lymphozyten, die im Thymus normalerweise aus den Thymozyten heranreifen. Während die Anzahl der B-Lymphozyten in der Nacktmaus normal ist, fehlen die

ausgereiften T-Lymphozyten als wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Aus diesem Grund hat sich die Nacktmaus zu einem bewährten Modell für allogene und xenogene Transplantationen entwickelt<sup>96</sup>. Da bei der Implantation von Tumorgewebe oder Tumorzellen mit kaum einer Abstoßungsreaktion zu rechnen ist, wurde diese Spezies als ideales Versuchstier gewählt.

### **2.3.2 Anästhesie und Narkotika**

Vor der Injektion von Tumorzellen wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert, um Schmerzfreiheit und Relaxation zu erreichen. Die Inhalationsnarkose wurde in einem Glastopf durchgeführt, wobei die Tiere so lange darin belassen wurden, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war. Bewusstlosigkeit wurde durch Feststellung der fehlenden Bewegung der Tiere, des Ausbleiben des Lidschlags und der Abflachung der Atmung festgestellt.

Um eine ausreichend tiefe Narkose zur Implantation von soliden Tumorstücken zu erreichen, wurde den Versuchstieren 0,05 ml der Narkoselösung (siehe Abschnitt 2.1.3, 0,1 ml 2% Xylazin, 0,8 ml Ketamin, 0,1 ml 0,9% NaCl) in die Bauchhöhle injiziert.

### **2.3.3 Injektion von Tumorzellen**

Die Mäuse wurden durch Inhalation von Isofluran kurz narkotisiert, woraufhin eine definierte Anzahl an Tumorzellen der Linie CT26 subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert wurde (siehe Abschnitt 2.3.4).

### **2.3.4 Frequenzbestimmung der Tumorstammzellen**

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, wie viele Zellen der CT26-Kultur (P0) benötigt werden, um in vivo einen Tumor zu generieren

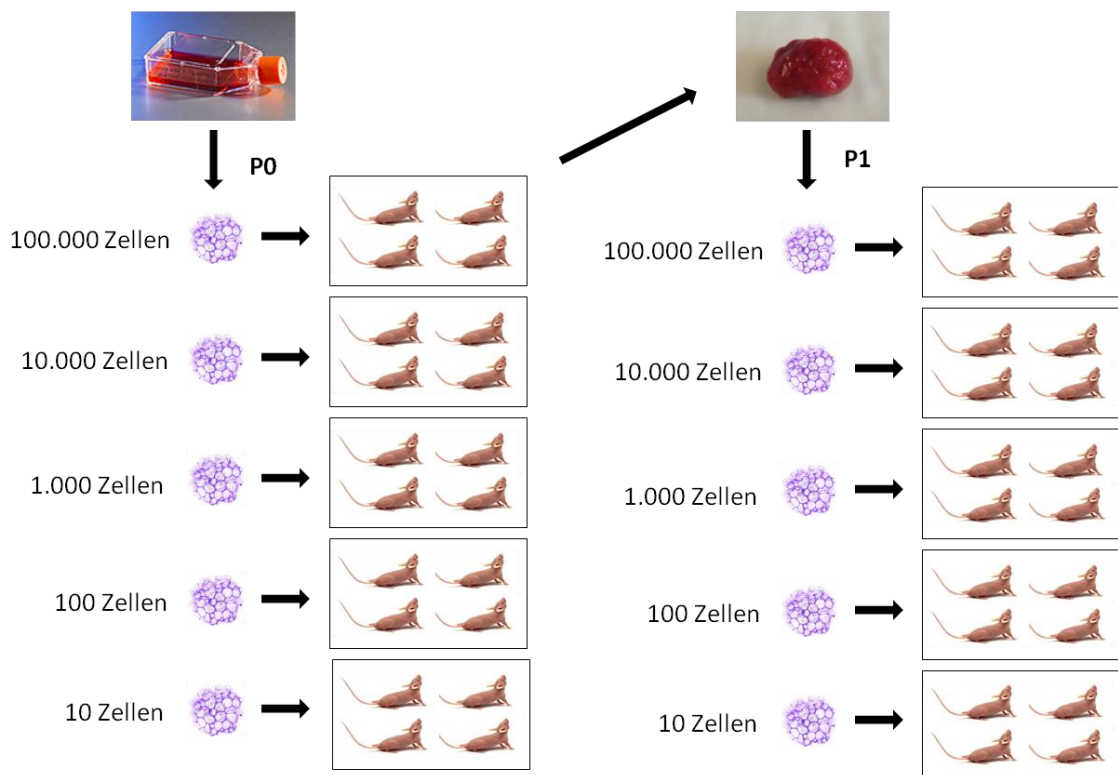
P0:

Jeweils vier Mäusen wurden 100.000, 10.000, 1.000, 100 und 10 CT26-Zellen aus der Zellkultur subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert und das Tumorwachstum

jeden zweiten Tag dokumentiert. Bei ausbleibendem Tumorwachstum wurden die Mäuse nach 8 Wochen (56 Tagen) getötet.

P1:

Hierfür wurde den Mäuse aus der ersten Versuchsreihe P0 Tumor entnommen, in Einzelzellsuspension gebracht und jeweils vier Mäusen 100.000, 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Erneut wurde das Tumorwachstum engmaschig kontrolliert, bei fehlgeschlagenem Tumorwachstum wurden die Mäuse ebenfalls nach 8 Wochen (56 Tagen) getötet.



**Abbildung 2.3 Frequenzbestimmung der Tumorstammzellen in vivo**

**P0-Generation:** Aus der Zellkultur der Linie CT26 wurden  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  sowie 10 Zellen entnommen und jeweils vier Mäusen subkutan in die Flanken injiziert.

**P1-Generation:** In der P0-Generation entstandener Tumor wurde entnommen, in Einzelzellsuspension gebracht und wiederum  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 Zellen jeweils vier Mäusen subkutan in die Flanken injiziert.



### **2.3.5 Implantation von soliden Tumorstücken**

Zuerst wurde den Mäusen 0,05 ml des Narkosemittels in die Bauchhöhle injiziert. Nach Erreichen vollständiger Bewusstlosigkeit wurde ein kleiner Schnitt in die Haut der rechten und linken Flanke der Versuchstiere gesetzt. Dieser Einschnitt wurde mit einer Schere stumpf höhlenartig erweitert und ein Tumorstück von 1 - 2 mm Kantenlänge möglichst tief in die Inzision eingesetzt. Abschließend wurde der Einschnitt mit ein bis zwei Stichen in Einzelknopfnahut vernäht.

### **2.3.6 Entnahme des Tumors**

Die Versuchstiere wurden nach Narkotisierung durch CO<sub>2</sub> mit einem Genickbruch getötet, anschließend der in der Flanke subkutan platzierte Tumor freigelegt. Hierzu wurde die Haut kreisförmig um den Tumor aufgeschnitten und mitsamt diesem entfernt. Daraufhin wurde der Tumor von der restlichen Haut befreit, gewogen und mit einer Schieblehre in drei Dimensionen vermessen.



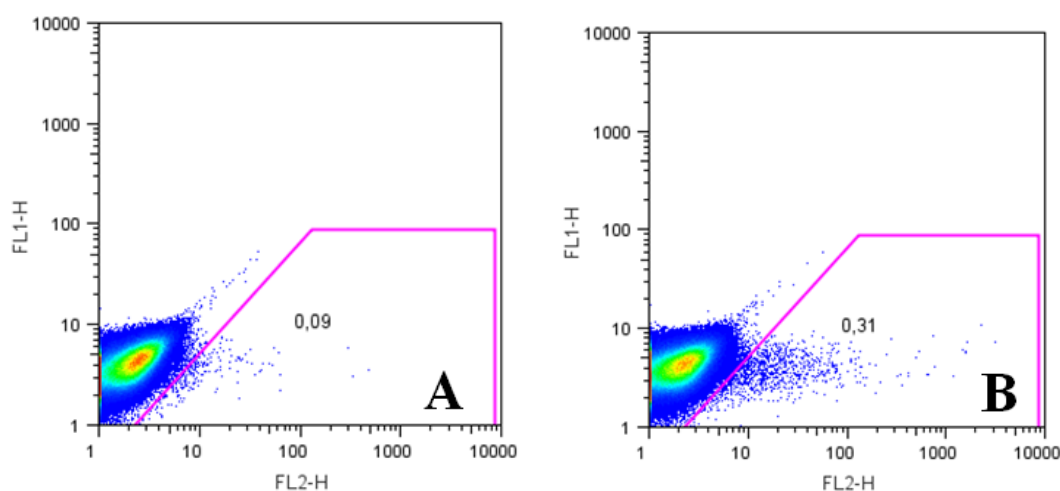
**Abbildung 2.4 Aus der Nacktmaus frisch entnommener Tumor**

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Zelllinie CT26

#### 3.1.1 Nachweis einer CD133<sup>+</sup>-Subpopulation

In den ersten Versuchen wurde die Zelllinie CT26 zunächst auf die Expression des Oberflächenmarkers CD133 untersucht, der als potentieller Tumorstammzellmarker gilt. Hierzu wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen Antikörper gefärbt und der Anteil der CD133-positiven Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Dabei konnte eine zwar prozentual geringe, jedoch stabile und eindeutig abgrenzbare CD133-positive Subpopulation identifiziert werden, deren Anteil an der Gesamtpopulation im Durchschnitt bei 0,2% (Konfidenzintervall 0,17% - 0,32%) lag.



**Abbildung 3.1** Prozentsatz der CD133-positiven Zellen in der CT26-Zellkultur

**A:** Färbung der CT26-Zellen aus der Zellkultur mit FC-Block (1:100) und Isotyp RatIgG1-PE (1:20).

**B:** Färbung der CT26-Zellen aus der Zellkultur mit FC-Block (1:100) und CD133-PE (1:20).

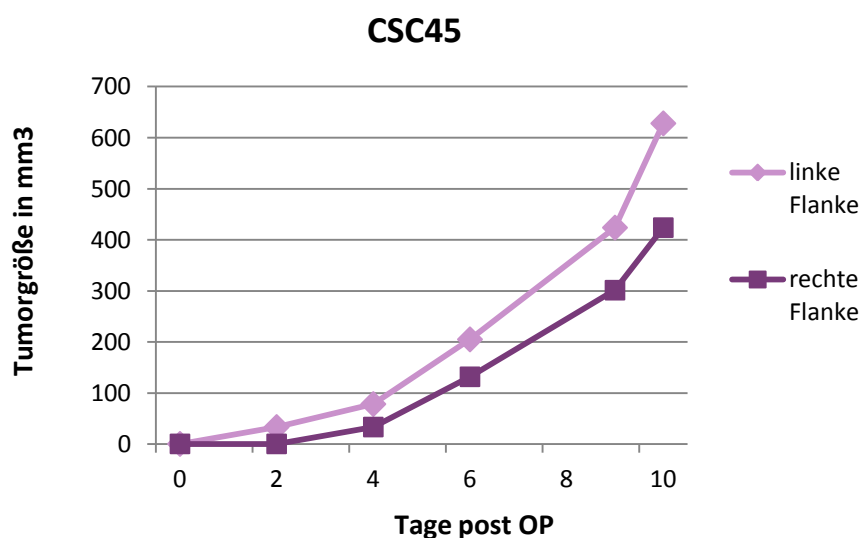
Der Anteil der CD133-positiven Zellen beläuft sich auf 0,22%.

### 3.1.2 Generierung subkutaner Tumore in vivo möglich

Zur weiteren Charakterisierung der Tumorzelllinie CT26 wurde untersucht, ob die Zellen die Fähigkeit zur Tumorgenerierung in vivo besitzen. Hierzu wurden je 100.000 Zellen aus der CT26-Zellkultur subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert und das Tumorwachstum engmaschig dokumentiert. Bei den Versuchstieren konnte ein Beginn des Tumorwachstums innerhalb von 3-4 Tagen beobachtet werden, wobei der Tumor nach 10 Tagen eine durchschnittliche Größe von 400 mm<sup>3</sup> erreichte.



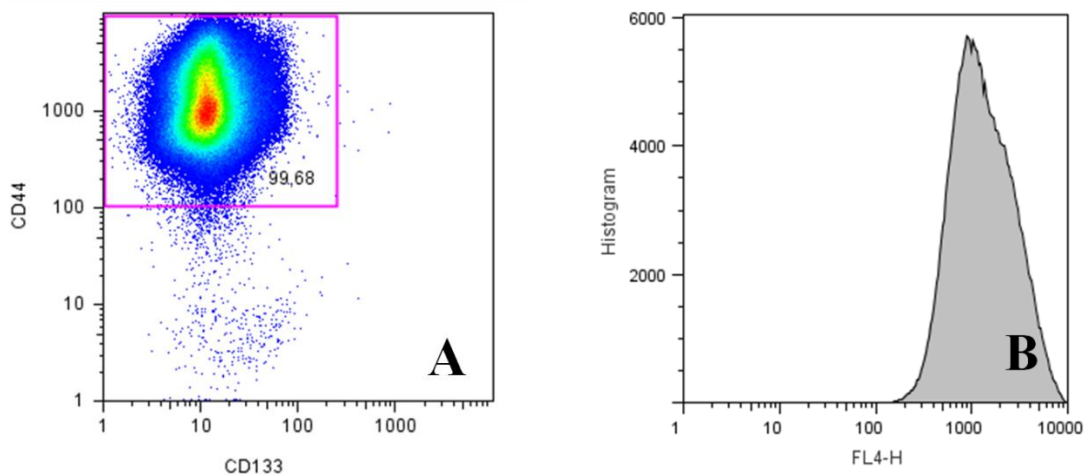
**Abbildung 3.2**  
Nacktmaus zeigt  
deutliches  
Tumorwachstum der  
rechten Flanke



**Abbildung 3.3**  
Wachstumskurve des  
Tumors über 10 Tage  
nach Injektion von  
100.000 Zellen pro Seite

### 3.1.3 Positivität für CD44

Um Tumorstammzellen in der CT26-Zelllinie genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen mit dem Antikörper CD44 angefärbt. CD44, ein Adhäsionsmolekül, das Hyaluronsäure bindet<sup>84</sup>, wurde bereits als Tumorstammzellmarker für verschiedene Karzinome, wie z.B. für das Mammakarzinom<sup>2</sup> und für das Kolonkarzinom<sup>28</sup> beschrieben, und scheint vielversprechend für die nähere Differenzierung und Isolierung von Tumorstammzellen zu sein. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab eine nahezu 100% Positivität der CT26-Zelllinie für CD44.



**Abbildung 3.4 Positivität der CT26-Zellen für CD44**

**A:** Über 99% der CT26-Zellen zeigen eine positive Färbung für CD44

**B:** Darstellung der Positivität für CD44 im Histogramm

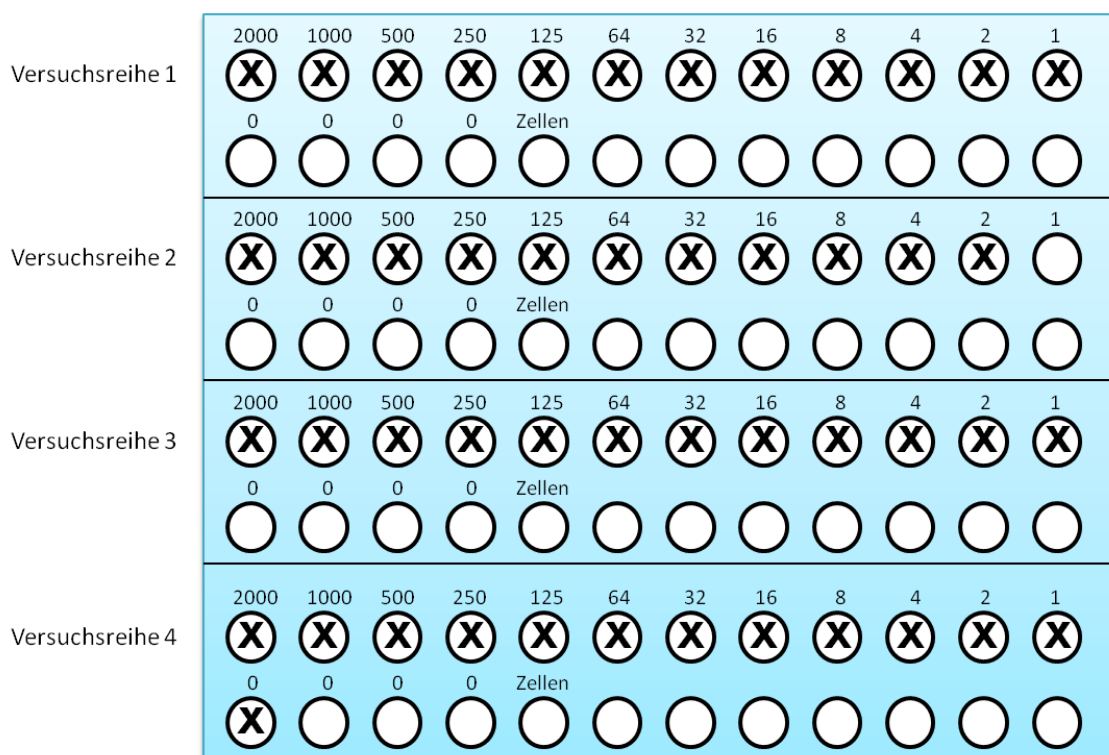
## 3.2 Analyse der Proliferationseigenschaften der Zelllinie CT26 in vitro

Bei den im Folgenden aufgeführten Versuchen wurde das Wachstumsverhalten der CT26-Zelllinie in Kultur sowie die Teilungsfähigkeit der einzelnen Zellen untersucht. Auf diese Weise sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob die Zelllinie sich durch einen hierarchischen Aufbau auszeichnet oder jede Zelle dieselben Proliferationseigenschaften besitzt.

### 3.2.1 Bestimmung der Proliferationsfrequenz im Limiting Dilution

#### Assay

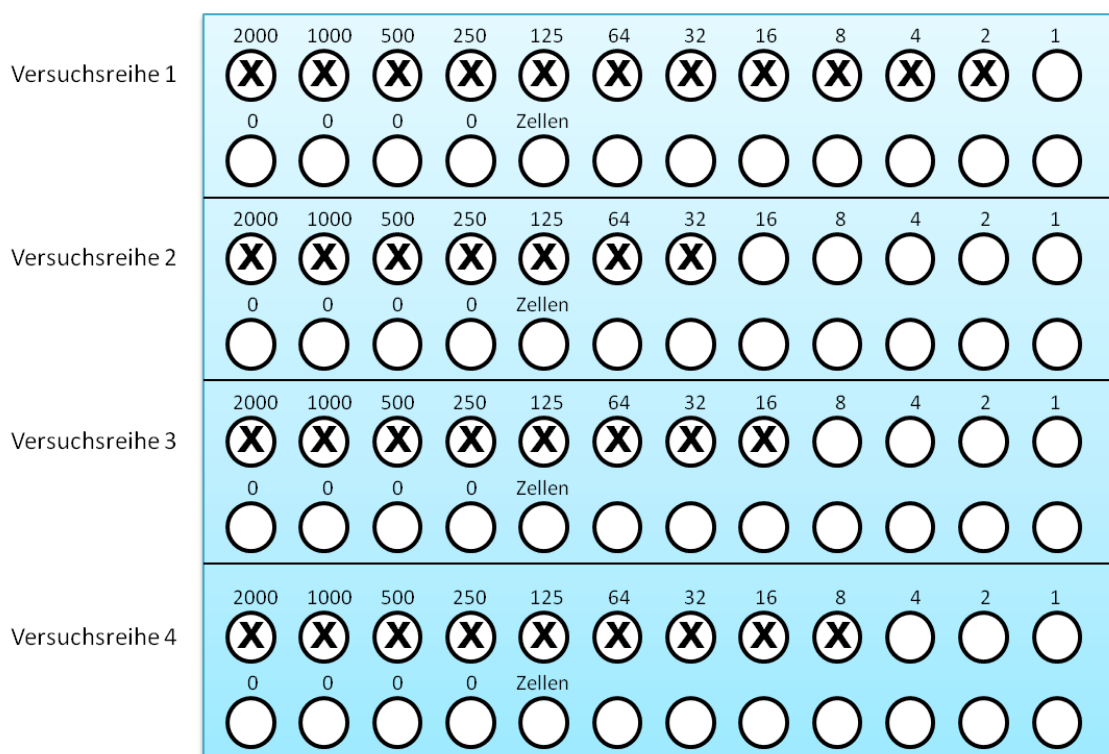
Bei dem hier dargestellten Versuch wurden ausgehend von 2.000 Zellen aus der Kultur der CT26-Zelllinie die Zellen in absteigender Verdünnung in eine 96 Well-Platte ausgesät und das Wachstumsverhalten nach 7 Tagen ausgewertet. Hierbei konnte im 4-Fach-Ansatz in jedem mit Tumorzellen beimpften Well Wachstum und Vermehrung der Zellen festgestellt werden – bis hin zu mit nur einer Zelle versehenen Wells. Daraus errechnet sich eine Proliferationsfrequenz von 1:1, d.h. jede Zelle besitzt die Fähigkeit sich in vitro zu vermehren.



**Abbildung 3.5 Limiting Dilution Assay in vitro, P0-Generation: Aussaat der CT26 Zellen aus der Zellkultur in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2.000 Zellen. Jede Zelle ist zur Teilung fähig, Frequenz 1:1. X bedeutet Wachstum der Zellen, mikroskopisch verifiziert.**

Im weiteren Versuchsverlauf wurden jeweils vier Tumore, die durch Injektion der CT26-Zellen in vier Nacktmäusen entstanden waren, den Mäusen entnommen und in Einzelzellsuspension gebracht. Wiederum ausgehend von 2.000 Zellen wurden diese

Zellen im Rahmen einer Verdünnungsreihe im 4-Fach-Ansatz in eine 96 Well-Platte ausgesät, woraufhin nach 7 Tagen die Auswertung des Wachstumsverhaltens der Zellen erfolgte. Hierbei konnte variabel von 32 bis zu 2 ausgesäten Zellen Wachstum nachgewiesen werden. Die errechnete Proliferationsfrequenz beträgt in diesem Fall 1:11, d.h. nur eine aus elf Zellen, die aus dem soliden Tumor in vivo gewonnen wurden, sind in der Lage wiederum Wachstum zu initiieren.



**Abbildung 3.6 Limiting Dilution Assay in vitro, P1-Generation: Aussaat der Tumorzellen, die aus einem soliden Tumor der Nacktmaus isoliert wurden, in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2.000 Zellen. Bis zu 32 ausgesäte Zellen zeigen sich durchgängig teilungsfähig, Frequenz 1:11. X bedeutet Wachstum der Zellen, mikroskopisch verifiziert.**

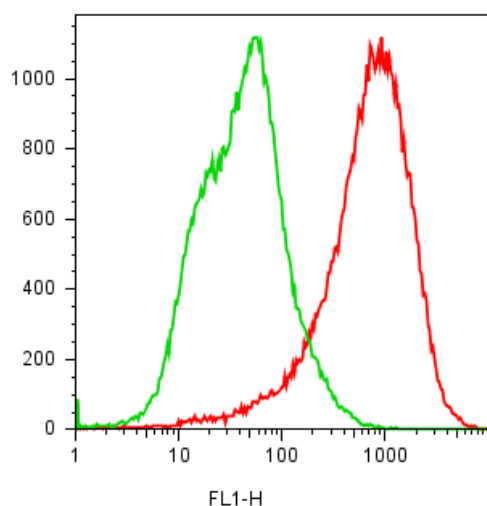
### 3.2.2 Teilungsfähigkeit jeder Zelle in der CFSE-Färbung

Die Färbung mit CFSE und anschließende durchflusszytometrische Analyse sollte weitere Rückschlüsse über das Teilungsverfahren der CT26-Zellen erbringen. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich bei der Mitose gleichmäßig auf beide Tochterzellen aufteilt und es so ermöglicht, anhand der Fluoreszenzabnahme die Anzahl der Tochtergenerationen zu identifizieren.

Die eine Hälfte wurde als Vergleichsgruppe drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt, wo erwartungsgemäß keine Zellteilung erfolgen sollte. Die zweite Hälfte wurde bei 37°C im Wärmeschränk kultiviert, so dass sich die Zellen unter Standardbedingungen vermehren konnten. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

Die rote Kurve zeigt die Speicherung von CFSE der im Kühlschrank aufbewahrten Zellkultur, bei der keine Zellteilung mehr stattfand. Die grüne Kurve hingegen repräsentiert die unter Standardbedingungen kultivierten Zellen, bei denen man in der Gesamtpopulation eine gleichmäßige Abnahme der Fluoreszenzintensität feststellen kann. Aus diesem Messergebnis kann man schließen, dass sich jede Zelle gleich oft geteilt hat. Jede Zelle hat das gespeicherte CFSE bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochtergeneration weitergegeben, so dass es zur gleichmäßigen Fluoreszenzabnahme der gesamten Population kam.

Würde es eine Subpopulation geben, die sich nicht oder nur sehr langsam teilt, müsste man eine zwei- oder mehrgipflige Kurve erwarten, wobei der Peak der nicht proliferierenden Zellen unter der roten Kurve zu erwarten wäre.



**Abbildung 3.7 CFSE-Färbung**

**Rote Kurve: CFSE-gefärbte Zellen drei Tage im Kühlschrank. Keine Zellteilung nachweisbar, ausschließlich Speicherung von CSFE.**

**Grüne Kurve: CFSE-gefärbte Zellen drei Tage in Kultur. Fluoreszenzabnahme der Gesamtpopulation und somit gleichmäßige Aufteilung von CFSE auf die Tochtergeneration lässt auf die Teilungsfähigkeit jeder einzelnen Zelle schließen.**

### 3.2.3 Keine Ausbildung sphärischer Kulturen

Um das Verhalten der CT26-Zelllinie in Kultur weiter zu charakterisieren, wurden die Zellen in einem speziell angesetzten Medium ohne FCS, jedoch unter Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 kultiviert. Kolosphären bezeichnen analog zu

Neurosphären ein dreidimensionales multizelluläres Tumormodell, das direkt aus frisch in Kultur gebrachten Zellen eines Kolonkarzinoms entsteht. Charakteristisch für diese Kolosphären ist, dass sie nur aus lebenden Zellen des Kolonkarzinoms entstehen, nicht jedoch aus normaler Kolonmukosa. Zudem korreliert die Fähigkeit zur Kolosphärenbildung statistisch signifikant mit erhöhter Aggressivität des Tumors sowie dem Potential zur Metastasierung<sup>95,118</sup>. Die Generierung von Kolosphären wäre somit möglicherweise hilfreich, um anhand dieses Modells die Vorgänge der Metastasierung genauer zu erforschen.

Ohne Zugabe von FCS sowie unter Zugabe oben erwähnter Wachstumsfaktoren sollte erwartungsgemäß keine Adhäsion der Zellen stattfinden, sondern die Formation frei flottierender Zellorganisationen, sog. sphärischer Kulturen.

Bei nachfolgend beschriebenen Versuchen werden die CT26-Zellen aus der Zellkultur als P0-Generation bezeichnet. Die Injektion der P0-Generation in Nacktmäuse und anschließende Isolierung und Aufreinigung der entstandenen Tumore bringt die P1-Generation hervor. Eine Aussaat der P0-Generation ergab eine Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturflasche und zeigte Wachstum vergleichbar zur regulären Zellkultur. In der P1-Generation konnte so gut wie keine Adhäsion der Zellen beobachtet werden, allerdings ließ sich keine ersichtliche Bildung von Kolosphären nachweisen, lediglich eine gewisse Verklumpung der Zellen.

Zusammenfassend konnte weder in der P0- noch in der P1-Generation der CT26-Zelllinie die Formation von sphärischen Kulturen dokumentiert werden.

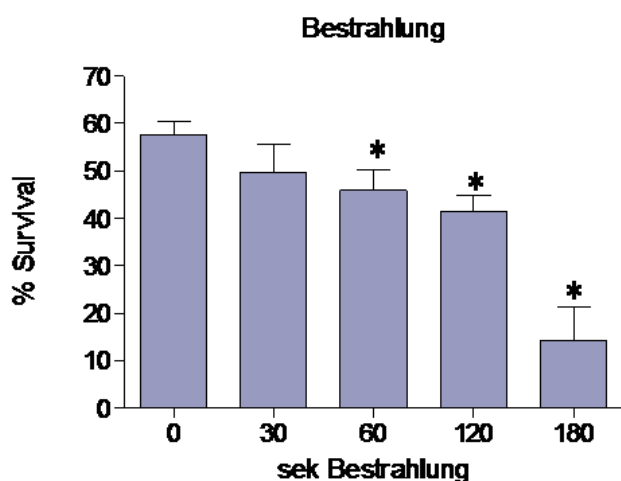
### **3.2.4 Funktionelle Anreicherung durch Radiatio und Chemotherapie**

Bei dem hier dargestellten Versuch wurde die Zelllinie CT26 zum einen über einen zunehmenden Zeitraum von 0 bis 180 Sekunden bestrahlt, zum anderen mit ansteigenden Konzentrationen des Chemotherapeutikums 5-Fluoruracil ausgehend von einer Dosierung von 0  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  behandelt. Die Zellen wurden daraufhin 7 Tage in Kultur belassen, anschließend die Frequenz der überlebenden Zellen mit Hilfe einer PI-Färbung in der Durchflusszytometrie bestimmt.

Nach 7 Tagen in Kultur ohne Mediumswechsel zeigten die ohne Bestrahlung kultivierten Zellen eine Überlebensrate von 57%. Bei Bestrahlung über 30s, 60s und 120s ließ sich ein leichter, kontinuierlicher Abfall der überlebenden Zellen beobachten,

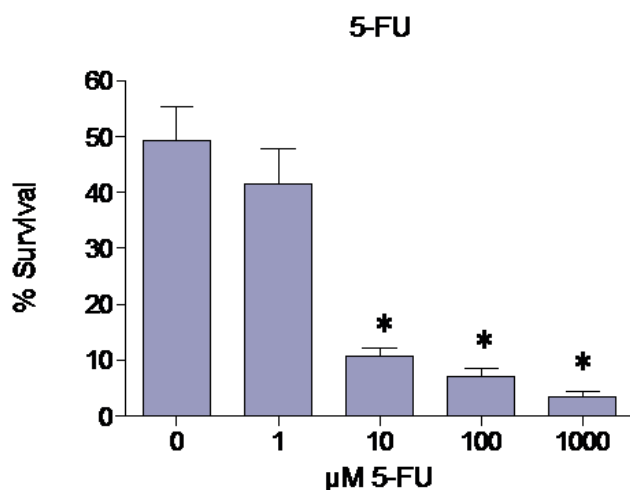


die von 50% (30s) auf 46% (60s) bis 42% (120s) absanken. Ein deutlicher Knick in der Überlebensrate machte sich erst bei Bestrahlung über 180s bemerkbar, wo der Prozentsatz der lebenden Zellen nur noch rund 15% betrug.



**Abbildung 3.8**  
Prozentuales Überleben der CT26-Zellen aus der Kultur nach Bestrahlung über einen Zeitraum von 0 bis 180 Sekunden.

Im zweiten Versuchsteil wiesen die ohne Zugabe des Chemotherapeutikums 5-FU über 7 Tage ohne Mediumswechsel kultivierten Zellen eine Überlebensrate von rund 50% auf. Bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  5-FU ließen sich noch 40% lebende Zellen nachweisen. Ab der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  5-FU konnte allerdings ein rapider Abfall der Überlebensquote beobachtet werden, so dass der Prozentsatz lebender Zellen hier bei 11% lag. Bei Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  5-FU ließen sich 8% lebende Zellen nachweisen, bei Inkubation mit 1000  $\mu\text{M}$  5-FU noch 5% lebende Zellen.

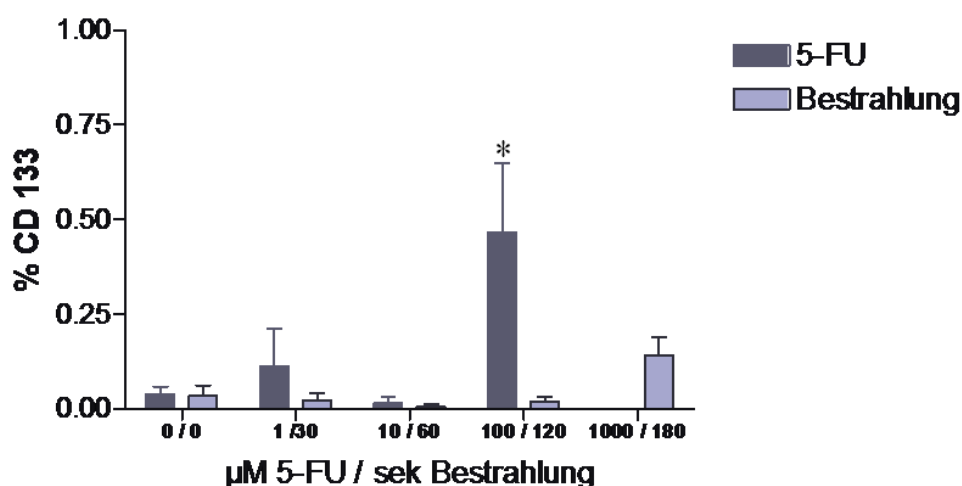


**Abbildung 3.9**  
Prozentuales Überleben der CT-26 Zellen aus der Kultur nach Behandlung mit 5-FU von 0  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$ .

Im dritten Versuchsteil wurden die überlebenden Zellen jeweils mit dem Antikörper CD133 markiert, um den Anteil der CD133<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtzahl der überlebenden Zellen bestimmen zu können. Bei den nichtbehandelten Zellen sowohl der Bestrahlungs- als auch der Chemotherapeutikagruppe zeigte sich, wie in früheren Versuchen bereits beobachtet, ein sehr geringer Prozentsatz CD133<sup>+</sup>-Zellen, der unter 0,1% lag.

Bei Bestrahlung über 30s, 60s und 120s ließen sich ähnlich niedrige bis noch geringere Prozentzahlen an CD133<sup>+</sup>-Zellen feststellen. Lediglich die über 180s bestrahlten Zellen wiesen einen leichten Anstieg der CD133<sup>+</sup>-Zellen auf 0,175% auf, der zwar keine signifikante Aussage, jedoch eine Tendenz über die Resistenz der CD133<sup>+</sup>-Zellen gegenüber zunehmender Strahlenbelastung zulässt.

Die mit 1 µM und 10 µM 5-FU behandelten Zellen ließen ähnlich der Kontrollgruppe der nichtbehandelten Zellen nur geringe Prozentsätze von 0,1% bzw. 0,003% an CD133<sup>+</sup>-Zellen beobachten. Bei den mit 1000 µM 5-FU inkubierten Zellen war auf Grund der geringen Gesamtüberlebensrate aller Zellen keine Bestimmung des Anteils der CD133<sup>+</sup>-Zellen möglich. Lediglich die mit 100 µM 5-FU versehenen Zellen wiesen einen deutlich erhöhten Prozentsatz von 0,45% an CD133<sup>+</sup>-Zellen auf, der sich als signifikant erhöhte Resistenz der CD133<sup>+</sup>-Zellen gegenüber 5-FU werten lässt.



**Abbildung 3.10** Prozentsatz der überlebenden CD133-positiven Zellen nach definierten Bestrahlungszeiträumen sowie der Behandlung mit definierten Konzentrationen 5-FU.

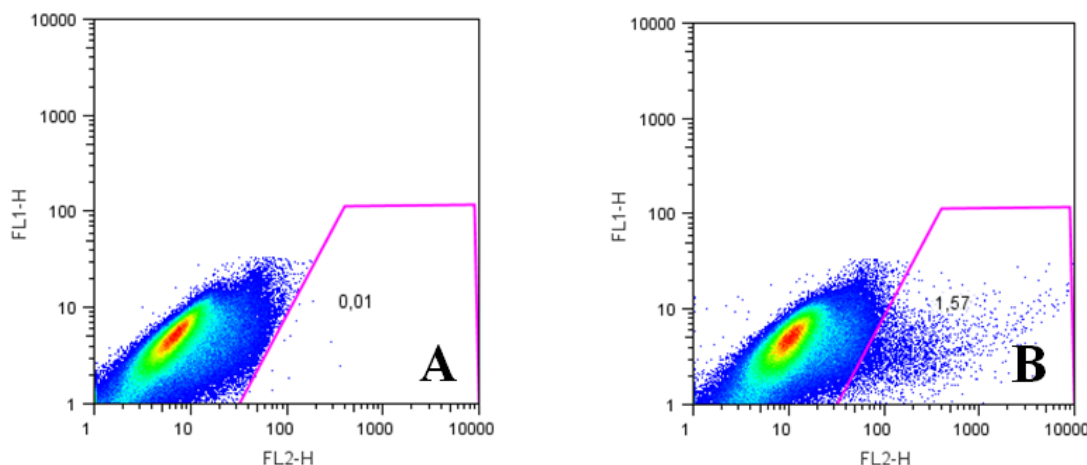
\* Signifikante Anreicherung der mit 100 µM 5-FU behandelten CD133-positiven Zellen.

### **3.3 Tumorgenerierungspotential der Zelllinie CT26 im Nacktmausmodell**

Bei den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde die Zelllinie CT26 auf ihre Fähigkeit zur Tumorerzeugung *in vivo* untersucht. Hierzu wurden definierte Zellzahlen subkutan in die Flanken der Nacktmäuse injiziert, das Tumorstadium engmaschig dokumentiert sowie der Tumor nach Entnahme sorgfältig aufgearbeitet in Zellkultur gebracht, weitertransplantiert und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des Oberflächenmarkers CD133 analysiert.

#### **3.3.1 Fraktion der CD133-positiven Zellen wird *in vivo* größer**

Der aus der Nacktmaus isolierte Tumor der Zelllinie CT26 wurde für den hier beschriebenen Versuch in Einzelzellsuspension gebracht und daraufhin mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des potentiellen Tumorstammzellmarkers CD133 untersucht. Hierbei ließ sich eine CD133<sup>+</sup>-Subpopulation definieren, deren Prozentsatz bei 1,3% (Konfidenzintervall 0,87% - 1,56%) lag. Die Identifizierung der CD133<sup>+</sup>-Fraktion wurde analog zu den aus der Zellkultur gewonnenen Ergebnissen durchgeführt. Hierbei betrug der Anteil der CD133<sup>+</sup>-Zellen allerdings nur 0,2%. Bei den aus dem Tumor *in vivo* gewonnenen Tumorzellen wurde somit ein 6,5fach erhöhter Anteil der CD133<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den Tumorzellen aus der Zellkultur gemessen. Dies deutet auf eine Zunahme der CD133-Subpopulation während des Tumorstadiums *in vivo* hin.



**Abbildung 3.11** Prozentsatz der CD133-positiven Zellen aus dem durch CT26-Zellen initiierten Tumor der Nacktm Maus

**A:** Färbung der Tumorzellen mit FC-Block (1:100) und Isotyp RatIgG1-PE (1:20).

**B:** Färbung der Tumorzellen mit FC-Block (1:100) und CD133-PE (1:20).

Der Anteil der CD133-positiven Zellen beläuft sich hierbei auf 1,56%.

### 3.3.2 Reisolierte Zellen haben weniger Tumore initiiert

Weiterhin wurde eine Verdünnungsreihe konzipiert, in deren Rahmen vier Nacktmäuse mit einer um jeweils eine Zehnerpotenz verringerte Anzahl an CT26-Zellen aus der Zellkultur beimpft wurden. Es wurden demnach  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  sowie 10 Zellen in die rechte und linke Flanke der Nacktmäuse injiziert und das Tumorstadium über maximal 58 Tage engmaschig dokumentiert (siehe Abbildung 2.3).

Die Injektion der maximalen Dosis von 100.000 Zellen führte in allen vier Versuchstieren auf beiden Seiten zu einem Tumorstadium, während bei den mit 10.000 Zellen versehenen Nacktmäusen nur noch in vier von acht Fällen das Wachstum eines Tumors zu beobachten war. Unter den mit 1.000 Zellen beimpften Mäusen zeigte sich nur in drei von acht Versuchsproben ein Tumorstadium, wohingegen die Injektion von 100 sowie 10 Zellen in keinem einzigen Fall zur Generierung eines Tumors führte. Aus dem Anteil der erzeugten Tumore bezogen auf die Gesamtzahl der Tiere und injizierten Zellen wurde mit Hilfe der L-Calc™ Limiting Dilution Software (Stemcell Technologies, Grenoble, France) die Frequenz der tumorinitiiierenden Zellen errechnet. Bei der soeben beschriebenen P0-Verdünnungsreihe ergab sich eine Frequenz

von 1 : 9.107 Zellen, d.h. eine aus 9.107 Zellen besäße die Fähigkeit das Wachstum eines neuen Tumors in vivo zu initiieren.

**Tabelle 3.1 Verdünnungsreihe P0: Je  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 CT26-Zellen aus der Zellkultur wurden vier Nacktmäusen subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. x bedeutet Tumorwachstum, - kein Tumorwachstum. Die Frequenz der tumorinitiierenden Zellen betrug 1 : 9.107 Zellen.**

Zellzahl	Maus	Tumorwachstum		Versuch beendet
		links	rechts	Tag
100 000	CSC 54	x	x	17
100 000	CSC 55	x	x	09
100 000	CSC 56	x	x	09
100 000	CSC 57	x	x	17
10 000	CSC 58	x	x	24
10 000	CSC 59	-	-	58
10 000	CSC 60	-	x	34
10 000	CSC 61	-	x	49
1 000	CSC 62	x	-	52
1 000	CSC 63	-	x	49
1 000	CSC 64	x	-	49
1 000	CSC 65	-	-	58
100	CSC 66	-	-	58
100	CSC 67	-	-	58
100	CSC 68	-	-	58
100	CSC 69	-	-	58
10	CSC 70	-	-	58
10	CSC 71	-	-	58
10	CSC 72	-	-	58
10	CSC 73	-	-	58

Im weiteren Versuchsverlauf wurden zwei Tieren der P0-Verdünnungsreihe Tumor entnommen, in Einzelzellsuspension gebracht und gemäß dem oben beschriebenen Schema wiederum in absteigenden Zehnerpotenzen von 100.000 bis 10 Zellen jeweils vier Nacktmäusen in die rechte und linke Flanke injiziert (siehe Abbildung 2.3).

Nach Dokumentation des Tumorwachstums über maximal 58 Tage ergaben sich folgende Beobachtungen: In der Gruppe der mit 100.000 Zellen beimpften Nacktmäusen zeigte sich in der Hälfte der Fälle ein Tumorwachstum, während bei allen anderen mit 10.000, 100 sowie 10 Zellen versehenen Versuchstiere das Tumorwachstum ausblieb. Einzig in der Gruppe mit 1.000 Zellen war in einem Falle die Entstehung eines Tumors zu beobachten.

Aus der Anzahl der erzeugten Tumore im Verhältnis zur Gesamtzahl der injizierten Zellen wurde wiederum mit der L-Calc™ Limiting Dilution Software (Stemcell Technologies, Grenoble, France) der Anteil der tumorinitiierenden Zellen berechnet. Für diese Verdünnungsreihe der 2. Generation ergab sich eine Frequenz von 1 : 132.699, d.h. eine aus 132.699 Zellen besäße das Potential einen neuen Tumor zu generieren.

**Tabelle 3.2 Verdünnungsreihe P1: Je  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 Zellen, die aus in Nacktmäusen induzierten Tumoren isoliert worden waren, wurden wiederum vier Nacktmäusen subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert.**

**x bedeutet Tumorwachstum, - kein Tumorwachstum.**

**Die Frequenz der tumorinitiierenden Zellen betrug 1 : 132.699 Zellen.**

Zellzahl	Maus	Tumorwachstum		Versuch beendet
		links	rechts	Tag
100 000	CSC 78	X	x	35
100 000	CSC 79	X	-	56
100 000	CSC 80	-	-	58
100 000	CSC 81	-	x	32
10 000	CSC 82	-	-	58
10 000	CSC 83	-	-	58
10 000	CSC 84	-	-	58
10 000	CSC 85	-	-	58

Zellzahl	Maus	Tumorwachstum		Versuch beendet
		links	rechts	Tag
1 000	CSC 86	-	-	58
1 000	CSC 87	-	-	58
1 000	CSC 88	-	-	58
1 000	CSC 89	-	x	33
100	CSC 90	-	-	58
100	CSC 91	-	-	58
100	CSC 92	-	-	58
100	CSC 93	-	-	58
10	CSC 94	-	-	58
10	CSC 95	-	-	58
10	CSC 96	-	-	58
10	CSC 97	-	-	58

### 3.3.3 Tumore aus reisolierten Zellen sind kleiner und entstehen später

In der weiteren Versuchsauswertung wurde der Zeitpunkt der Tumorentstehung in den verschiedenen Untergruppen der P0- und der P1-Generation sowie die beiden Generationen miteinander verglichen. Bei nachfolgenden Betrachtungen wurde jeweils der Median ermittelt, da sich dieser im Gegensatz zum Durchschnittswert unempfindlicher gegenüber Ausreißern darstellt und somit für die Interpretation der Messwerte besser geeignet erschien.

In der P0-Generation konnte in der Gruppe mit 100.000 injizierten Zellen in allen acht Fällen Tumorwachstum nachgewiesen werden, wobei sich im Median nach 4,5 Tagen die makroskopische Entstehung eines Tumors zeigt. Das Tumorwachstum wurde über maximal 14 Tage beobachtet, danach wurde der Versuch beendet. Die Mäuse wurden ebenfalls getötet, wenn sie über 10% ihres Ausgangsgewichtes verloren hatten. Unter diesen Bedingungen belief sich die im Median erreichte Tumorgroße auf 700 mm<sup>3</sup>.

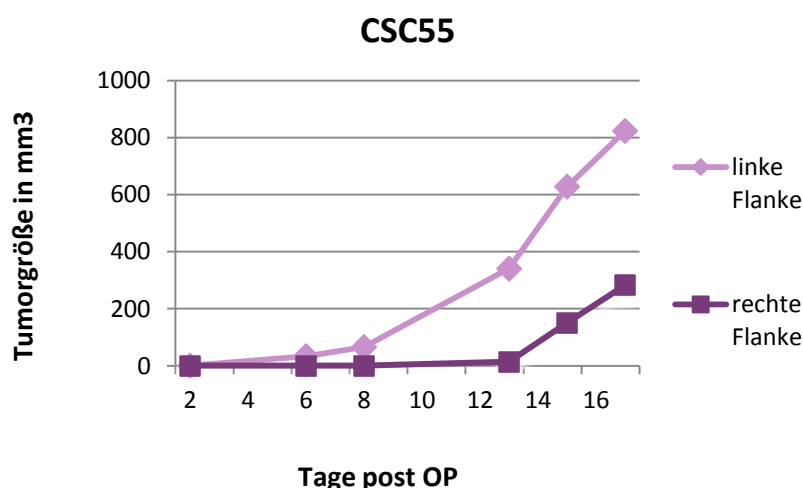
In der Gruppe der mit 10.000 Zellen versehenen Nacktmäuse wurde in vier von acht Fällen die Entstehung eines Tumors nachgewiesen, wobei die mediane Dauer bis zum

Beginn des makroskopischen Tumorwachstums 17,5 Tage betrug. Die im Median gemessene Tumorgröße wurde hierbei mit  $745 \text{ mm}^3$  bestimmt.

Die Gruppe mit 1.000 injizierten Zellen, die letzte in der Tumorstudie nachgewiesen wurde, zeigte dies in drei von acht Fällen. Der Beginn der Tumorentstehung konnte im Median nach 38 Tagen dokumentiert werden, wobei sich die mediane Größe der Tumoren auf  $472 \text{ mm}^3$  belief.

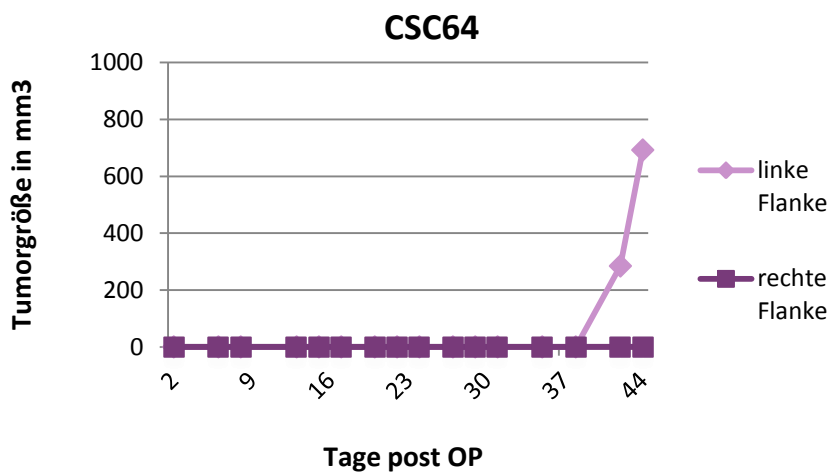
Zusammenfassend kann man sagen, dass sich der Beginn des Tumorwachstums verzögerte, je weniger Zellen injiziert wurden. Konkret verschob sich die makroskopisch sichtbare Entstehung des Tumorwachstums von 4,5 Tagen (100.000 Zellen) über 17,5 Tage (10.000 Zellen) auf 38 Tage (1.000 Zellen). Interessanterweise konnte man beobachten, dass bei einem relativ raschen Beginn des Tumorwachstums die Größe des Tumors kontinuierlich über zehn bis 15 Tage hinweg zunahm, während bei einem relativ spät einsetzendem Tumorwachstum oft eine rapide Größenzunahme des Tumors über nur vier bis sechs Tage dokumentiert wurde (siehe Abbildung 3.12 und 3.13).

Weiterhin kann man feststellen, dass in der Gruppe mit 1.000 injizierten Zellen die Tumore durchschnittlich geringere Größen erreichten als in den Gruppen mit 100.000 sowie 10.000 Zellen.



**Abbildung 3.12**  
Langsameres und kontinuierliches Tumorwachstum bei Injektion von 100.000 Zellen und relativ frühem Wachstumsbeginn





**Abbildung 3.13**  
**Rasch**  
**progredientes**  
**Tumorstadium**  
**mit spätem**  
**Wachstumsbeginn**  
**bei Injektion von**  
**1.000 Zellen**

**Tabelle 3.3 Dokumentation des Beginns des Tumorstadiums sowie der maximal erreichten Größe in der P0-Generation**

Zellzahl	Maus	Beginn Tumorstadium (Tag)		Tumorstadium (mm <sup>3</sup> )	
		links	rechts	links	rechts
<b>100 000</b>	CSC 54	5	10	823	282
<b>100 000</b>	CSC 55	4	3	59*	85*
<b>100 000</b>	CSC 56	3	5	142*	33*
<b>100 000</b>	CSC 57	5	4	576	904
<b>10 000</b>	CSC 58	15	15	509	416
<b>10 000</b>	CSC 60	-	20	-	1238
<b>10 000</b>	CSC 61	-	38	-	980
<b>1 000</b>	CSC 62	49	-	231	-
<b>1 000</b>	CSC 63	-	38	-	918
<b>1 000</b>	CSC 64	38	-	472	-

\* Tumorstadium bis Tag 8, danach Entnahme des Tumors zur Weiterimplantation der Tumorzellen in die P1-Generation

In der P1-Generation wurde in der Gruppe mit 100.000 injizierten Zellen in vier von acht Fällen das Wachstum eines Tumors beobachtet, wobei sich der Beginn des Tumorwachstums im Median nach 22 Tagen zeigte. Die mediane Größe des Tumors belief sich dabei auf 517 mm<sup>3</sup>. Nach Injektion von 10.000 Zellen zeigte sich nach 58 Tagen kein Tumorwachstum, es wurde nur in der Gruppe von 1.000 injizierten Zellen in einem von acht Fällen die Entstehung eines Tumors dokumentiert. Dieser zeigte makroskopisches Wachstum ab Tag 26 und erreichte eine maximale Größe von 378 mm<sup>3</sup>.

**Tabelle 3.4 Dokumentation des Beginns des Tumorwachstums sowie der maximal erreichten Größe in der P1-Generation**

Zellzahl	Maus	Beginn Tumorwachstum (Tag)		Tumorgröße (mm <sup>3</sup> )	
		links	rechts	links	rechts
100 000	CSC 78	22	22	466	386
100 000	CSC 79	40	-	2345	-
100 000	CSC 81	-	22	-	567
1 000	CSC 89	-	26	-	378

### 3.3.4 Zusammenfassung

Vergleichend kann man feststellen, dass in der P1-Generation nicht nur in weniger Fällen die Entstehung eines Tumorwachstums beobachtet wurde, sondern es bei gleicher Anzahl injizierte Zellen zudem länger dauerte, bis sich ein neuer Tumor formte. In der P0-Generation kam es insgesamt in 15 von 40 Fällen zur Entstehung eines Tumors, wobei die Injektion von 100.000 Zellen in 100% der Fälle zum Tumorwachstum führte, die Injektion von 10.000 Zellen in 50 % der Fälle sowie die Injektion von 1.000 in 38% der Fälle.

Die P1-Generation zeigt nur in fünf von 40 Fällen die Formation eines Tumors, wobei es bei der Injektion von 100.000 Zellen in 50 % der Fälle zum Wachstum eines Tumors kam, bei der Injektion von 1.000 Zellen in 13% der Fälle.

Der Beginn des Tumorwachstums wurde in der P0-Generation bei Injektion von 100.000 Zellen nach 4,5 Tagen beobachtet, bei 10.000 Zellen nach 17,5 Tagen sowie bei 1.000 Zellen nach 38 Tagen. Vergleichend kam es in der P1-Generation bei

Injektion von 100.000 Zellen im Median nach 22 Tagen zur Entstehung des Tumors, bei 1.000 Zellen nach 28 Tagen.

Diese Tumore der P1-Generation zeigten wiederum nur ein geringeres Größenwachstum als die Vergleichstumore der P0-Generation. Hierbei führte in der P0-Generation die Injektion von 100.000 Zellen zu einer mittleren Tumorgröße von 700 mm<sup>3</sup>, die Injektion von 1.000 Zellen zu einer Tumorgröße von 472 mm<sup>3</sup>, wohingegen in der P1-Generation die Injektion von 100.000 Zellen nur einen Mittelwert von 517 mm<sup>3</sup> erreichte sowie bei 1.000 Zellen eine Größe von 378 mm<sup>3</sup>.

**Tabelle 3.5 Vergleich der P0- und P1-Generation in Bezug auf medianen Wachstumsbeginn des Tumors sowie maximal erreichte Tumorgröße.**

Zellzahl	Wachstumsbeginn (Tag)	
	P0-Generation	P1-Generation
<b>100 000</b>	4,5	22
<b>10 000</b>	17,5	-
<b>1 000</b>	38	26
Zellzahl	Tumorgröße (mm <sup>3</sup> )	
	P0-Generation	P1-Generation
<b>100 000</b>	700	517
<b>10 000</b>	745	-
<b>1 000</b>	472	378

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Modell der Tumorstammzellen im Kolonkarzinom. Diesem Modell entsprechend zeichnet sich ein Tumor durch einen heterogenen Aufbau aus, mit einer geringen Anzahl tumorinitiierender Zellen an der Basis. Diese besitzen ein erhöhtes Eigenvermehrungspotential und die Fähigkeit ausdifferenzierte Tumorzellen ohne Stammzeleigenschaften hervorzubringen. Weiterhin wird postuliert, dass diese tumorinitiierenden Zellen über eine vorrangige Expression von Stammzeleigenschaften verfügen, wodurch sie im Gegensatz zur Haupttumormasse möglicherweise eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aufweisen.

Als Tumormodell diente die murine Kolonkarzinomlinie CT26. Zur Identifizierung einer möglichen tumorinduzierenden Subpopulation wurde die Zelllinie CT26 mit den Antikörpern CD44 sowie CD133 markiert, zwei vielversprechenden Stammzellmarkern für das Kolonkarzinom. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte die gesamte Zelllinie eine positive Expression des Oberflächenmarkers CD44. Dahingegen konnte eine geringe, jedoch stabile CD133-positive Subpopulation identifiziert werden, die 0,2% der Gesamtpopulation ausmachte. Um Aufschlüsse über das Proliferationsverhalten der Kolonkarzinomlinie *in vitro* zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, bei der sich jede einzelne Zelle zur Initiation von Tumorwachstum *in vitro* fähig zeigte. Übereinstimmende Ergebnisse lieferte eine Färbung der Zelllinie mit CFSE, die bestätigte, dass sich jede Zelle unter Standardkulturbedingungen teilte. Im Weiteren wurde untersucht, inwiefern die Zelllinie zur Generierung von Tumoren in Nacktmäusen fähig sei. Hierzu wurde eine definierte Anzahl der CT26-Zellen von 100.000 Zellen in Zehnerpotenzen auf 10 Zellen absteigend subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert, wobei eine Anzahl von 100.000 Zellen zuverlässig zu Tumorwachstum führte. Die Fraktion CD133-positiver Zellen dieser Tumore stieg hierbei auf 1,3% im Gegensatz zu 0,2% aus der *in vitro* Kultur an. Die Injektion dieser Verdünnungsreihe in Nacktmäuse wurde zur Berechnung der Proliferationsrate *in vivo* herangezogen, wobei die Frequenz tumorinduzierender Zellen bei 1 : 9.100 lag. Die Zellen eines *in vivo* generierten Tumors wurden wiederum in einer Verdünnungsreihe in Nacktmäuse injiziert, hierbei ergab sich eine Frequenz der tumorinitiierenden Zellen von 1 : 133.000. Weiterhin

konnte man feststellen, dass diese reisolierten Zellen nicht nur weniger Tumore hervorbrachten, diese waren auch kleiner und entstanden später. Zuletzt wurde untersucht, ob die CD133-positive Subpopulation im Vergleich zu den CD133-negativen Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aufwiesen. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen 5-FU konnte eine signifikante Anreicherung der CD133<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich bei Bestrahlung mit hohen Dosen tendenziell eine höhere Resistenz der CD133<sup>+</sup>-Zellen.

## 4.1 Konzept „Stammzelle“

Stammzellen sind am Aufbau verschiedenster menschlicher Organe beteiligt, wie dem hämatopoetischen System<sup>112</sup>, der Epidermis<sup>6</sup>, der Leber<sup>37</sup> oder dem Gastrointestinaltrakt<sup>13,18,88</sup>. Auf Stammzellen basierende Zellverbände zeichnen sich durch einen hierarchischen Aufbau aus, bei dem die Stammzellen am Ausgangspunkt der Entwicklung und Erneuerung des Gewebes stehen. In den meisten Geweben stellen Stammzellen nur einen geringen Prozentsatz der Gesamtpopulation dar.

Stammzellen besitzen drei charakteristische Eigenschaften: Die Fähigkeit, ihren Bestand durch *Selbsterneuerung* aufrechtzuerhalten, d.h. die biologischen Eigenschaften der Elternzelle werden bei der Zellteilung auf eine identische Tochterzelle übertragen. Weiterhin verfügen Stammzellen über die Fähigkeit zur *Differenzierung*, indem sich ihre Nachkommenschaft zu reifen Zellen eines spezifischen Gewebes weiterentwickelt. Als Drittes sind sie mit dem Potential zur extensiven *Proliferation* ausgestattet. Die Kombination dieser drei Eigenschaften macht die Stammzelle einzigartig<sup>27</sup> (siehe auch Abschnitt 1.1.1).

Der Aspekt der Selbsterneuerung ist von besonderer Bedeutung, da Mutationen in diesen Regulationsmechanismen entscheidend für die Entstehung von Tumoren zu sein scheinen. Ein pathologisch erhöhtes Selbsterneuerungspotential in Kombination mit dem spezifischen Wachstumspotential der Stammzellen könnte in vielen Fällen für die Entwicklung eines malignen Phänotyps verantwortlich sein<sup>84</sup>.

## 4.2 Tumorstammzelltheorie

### 4.2.1 Analogien zwischen Stammzellen und tumorinitiierenden Zellen

Das Verständnis der Stammzellbiologie gewinnt immer größere Bedeutung, um tiefergehende Einsichten in die Entstehung von Tumoren erlangen zu können. Entsprechend der Tumorstammzelltheorie kann ein Tumor als aberrantes Organ angesehen werden, initiiert durch eine tumorigene Zelle, die über die Akkumulation von Mutationen mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation ausgestattet ist. Tatsächlich lassen viele Beobachtungen darauf schließen, dass Analogien zwischen normalen Stammzellen und tumorinitiierenden Zellen vorhanden zu sein scheinen<sup>84,92</sup>. Sowohl normale Stammzellen als auch tumorigene Zellen besitzen ein unermessliches Proliferationspotential sowie die Fähigkeit neues (normales oder anomales) Gewebe entstehen zu lassen. Sowohl Tumore als auch normale Organe setzen sich aus heterogenen Zellverbänden zusammen, die sich durch verschiedene Phänotypen und ein unterschiedliches Proliferationspotential auszeichnen<sup>35,78</sup>. Da die meisten Tumore klonalen Ursprungs sind<sup>32,34</sup>, müssen tumorinitiierende Zellen eine phänotypisch diverse Nachkommenschaft hervorbringen, darunter Tumorzellen mit unbeschränktem Proliferationspotential genauso wie Tumorzellen mit limitierter oder absolut fehlender Befähigung sich zu vermehren.

Nachdem normale Stammzellen genauso wie Tumorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass neu entstandene Tumorzellen sich die Selbsterneuerungsmechanismen zu eigen machen, welche normalerweise in Stammzellen exprimiert werden. So wurden bereits viele Signalwege, die klassischerweise mit der Tumorentstehung assoziiert werden, ebenfalls mit der Regulierung normaler Stammzellentwicklung in Verbindung gebracht. Derartige Signalwege, die zur Regulation dieser Prozesse in Frage kommen, beinhalten unter anderem Moleküle der Wnt-<sup>91,119</sup>, Notch-<sup>86,115</sup>, Sonic hedgehog-<sup>57,111</sup> und Bmi-1-<sup>59,85</sup> Familien.

Tumorzellen, die sich analog zu normalen Stammzellen durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und ein nahezu unendliches Proliferationspotential auszeichnen, werden daher als Tumorstammzellen bezeichnet.

## 4.2.2 Mechanismen der Tumorentstehung

Wenn die Signalwege, die normalerweise die Selbsterneuerung der Stammzellen regulieren, in deregulierter Form für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind, stellt sich die Frage, ob nicht die Stammzellen selbst in manchen Tumoren Ziel der Transformation zu tumorinitiierenden Zellen sind<sup>92,100</sup>. Zwei überzeugend erscheinende Gründe sprechen für diese Theorie: Einerseits sind Stammzellen bereits mit dem komplexen Mechanismus der Selbsterneuerung ausgestattet, so dass die Erhaltung dieser Aktivität einfacher erscheint als eine erneute Reaktivierung in differenzierteren Zellen. Weniger Mutationen wären also nötig um den Erhalt der Selbsterneureigenschaften zu gewährleisten, als um eine komplette Aktivierung erreichen zu müssen. Darüber hinaus zeichnen sich Stammzellen über ihre stete Selbsterneuerung durch eine sehr lange Lebensspanne aus, wohingegen die meisten differenzierten Zellen in Geweben mit hohem Zellumsatz bereits nach kurzer Zeit zu Grunde gehen. Aus diesem Grund ergibt sich für eine einzelne Stammzelle ein vielfach höheres Risiko diverse Mutationen zu akkumulieren, als es für die meisten reifen Zelltypen der Fall ist<sup>92</sup>. Alternativ ist es möglich, dass differenziertere Zelltypen über onkogenetische Mutationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung neu erlangen und somit zur tumorinitiierenden Zelle transformiert werden<sup>84</sup>.

Dieses Modell der Tumorentwicklung über sogenannte Tumorstammzellen scheint das klassische Konzept der Tumorentstehung herauszufordern. Dem traditionellen Modell entsprechend geht man davon aus, dass ein Tumor aus einer Reihe aufeinanderfolgender Einzelmutationen entsteht, die durch genetische Instabilität und spezifische Umwelteinflüsse in einer normalen Zelle akkumulieren. Hierbei entwickeln sich Tumorzellen über eine präneoplastische Phase zur manifesten Neoplasie und metastasieren schlussendlich<sup>105</sup>. Dieser Ablauf wurde insbesondere für das Kolonkarzinom tiefgründig erforscht und führte zur Entwicklung der Adenom-Karzinom-Sequenz<sup>33</sup> (siehe Abschnitt 1.2.3).

Früher konzentrierte sich die Forschung stark darauf, die genetischen Veränderungen zu entschlüsseln, welche eine Zelle zur Malignität hinführten. Dadurch konnte ein tieferes Verständnis für das Verhalten und die Entwicklung eines Tumors gewonnen werden, jedoch wurde wenig Recherche betrieben, welche Zellen genau von diesen Mutationen betroffen waren<sup>92</sup>. Jüngste Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass

Tumorstammzellen oder ihre unmittelbaren Nachkommen Angriffspunkte dieser initialen Mutationen sind, was als Hinweis für die Gültigkeit des Tumorstammzellmodells angesehen werden kann<sup>105</sup>. In den letzten Jahren gelang es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, anhand des Oberflächenmarkers CD133 eine Zellpopulation zu identifizieren, die für die Entstehung des Kolonkarzinoms verantwortlich gemacht werden kann<sup>80,95</sup>.

### 4.2.3 CD133 als Tumorstammzellmarker

CD133 (auch Prominin-1 genannt) ist ein Oberflächenprotein mit fünf Transmembrandomänen, das bevorzugt an Ausstülpungen von Plasmamembranen, wie epithelialen Mikrovilli exprimiert wird<sup>36,117</sup>. Initial wurde CD133 auf humanen hämatopoetischen Stammzellen entdeckt<sup>72,123</sup>, erlangte jedoch große Aufmerksamkeit durch seine Anreicherung in tumorinitiierenden Zellen verschiedenster solider Tumore<sup>73</sup>, darunter Hirntumore<sup>104</sup>, Prostata-<sup>23</sup>, Leber-<sup>64</sup> und Kolonkarzinome<sup>80,95</sup>. Es wird spekuliert, dass die membranösen Mikrodomänen von CD133 spezifische Komponenten für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften enthalten, deren Verlust über asymmetrische Teilung zur Differenzierung der Zelle führt<sup>10</sup>.

CD133 erschien zum Zeitpunkt der Arbeit der vielversprechendste Marker tumorinitiierender Zellen, daher untersuchten wir die murine Kolonkarzinomlinie CT26 primär auf die Expression dieses Oberflächenmarkers. Die Markierung der CT26-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD133 und anschließende Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie ergab eine geringe, jedoch stabile Subpopulation CD133<sup>+</sup>-Zellen von 0,2% (siehe Abbildung 3.1).

Bonnet et al. beschrieben in ihrer Publikation zur erstmaligen Entdeckung von tumorinitiierenden Zellen in AML eine Subpopulation CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Tumorzellen von 0,2%, die als einzige Population die Fähigkeit besaßen in NOD/SCID-Mäusen Leukämie zu initiieren sowie in Serie transplantiert zu werden<sup>17</sup>. Der erste Nachweis CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen gelang Singh et al. im Jahre 2004. Die Quantifizierung CD133<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie aus frisch isolierten, hoch aggressiven Zellen des Glioblastoms ergab einen Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen zwischen 19% – 29% während die Analyse aus Zellen des Medulloblastoms einen Prozentsatz CD133<sup>+</sup>-Zellen von 6% – 21% erbrachte<sup>104</sup>. O'Brien et al. führten Färbungen auf CD133 an humanen, frischen



Kolonkarzinomzellen durch, wobei sie einen Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen von 1,8% – 24,5% erhielten<sup>80</sup>. Ricci-Vitiani et al. erzielten bei selber Versuchsanordnung einen eindeutigen Nachweis CD133<sup>+</sup>-Zellen in Bereich von 2,5%<sup>95</sup>. Durchflusszytometrische Analysen zweier verschiedener Lebertumor-Zelllinien auf die Expression des Oberflächenproteins CD133 zeigten höchst unterschiedliche Ergebnisse des Anteils CD133<sup>+</sup>-Zellen als spezifische Eigenschaft der jeweiligen Zelllinie. Für die Zelllinie Huh-7 wurde der Prozentsatz CD133<sup>+</sup>-Zellen zwischen 25%<sup>76</sup> – 50%<sup>110</sup> beschrieben, während sich die Expressionsrate CD133<sup>+</sup>-Zellen bei der hepatokarzinösen Zelllinie SMMC7721 auf gerade einmal 0,1% – 1%<sup>123</sup> belief.

Im Weiteren wurde das Proliferationsverhalten der Kolonkarzinomlinie CT26 in vitro untersucht und im Rahmen einer Verdünnungsreihe ermittelt, wie viele Zellen zur Initiation einer Tumormorphose benötigt werden. Bei frisch aus der Kultur entnommenen Zellen konnte sich jede einzeln ausgesäte Zelle vermehren und eine neue Tumorkolonie bilden (siehe Abschnitt 3.2.1., Abbildung 3.5). Damit im Einklang stehen die Ergebnisse einer Färbung der Zelllinie mit CFSE, die bestätigte, dass sich jede Zelle unter Standardkulturbedingungen teilte (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 3.7). Die Verdünnungsreihe wurde weiterhin mit Tumorzellen durchgeführt, die aus einem in der Nacktmaus induzierten Tumor der Zelllinie CT26 gewonnen wurden. Aus den Ergebnissen konnte eine Proliferationsfrequenz von 1 : 11 Zellen bestimmt werden, d.h. eine aus elf frisch isolierten Tumorzellen war zur Proliferation in vitro fähig (siehe Abschnitt 3.2.1, Abbildung 3.6). Die Proliferationsfrequenz der aus dem Tumor isolierten Zellen unterschied sich maßgeblich zur Proliferationsfrequenz der CT26-Zellen aus der Zellkultur. Dies mag zum einen daran liegen, dass das der Nacktmaus entnommene Tumorgewebe nicht ausschließlich aus CT26-Zellen besteht, sondern durch Fibroblasten, vaskuläre Zellen sowie Stromazellen verunreinigt ist. Andererseits ist es möglich, dass sich die Proliferationseigenschaften der CT26-Zellen im Tumorzellverband in vivo verändern. Die veränderten Umwelteinflüsse, die in vivo auf den Tumor einwirken, führen möglicherweise zu einer Differenzierung der Zellen, so dass spezialisierte Tochterzellen entstehen, die die Fähigkeit zur Teilung verloren haben<sup>124</sup>.

Yoo et al. kamen in Einklang mit unseren Erkenntnissen zu dem Ergebnis, dass beliebige Einzelzellen einer murinen Lungen- und Mammakarzinom-Zelllinie allesamt zur Teilung fähig waren und neue Zellkulturen hervorbrachten. Sie injizierten daraufhin

$2 \times 10^5$  Zellen dieser Kulturen in die Flanke von histokompatiblen, nicht immunsupprimierten Mäusen und konnten zeigen, dass alle diese unabhängig voneinander aus einer einzelnen Zelle kultivierten Zellverbände zur Initiierung von Tumoren in vivo fähig waren<sup>124</sup>. Dies spricht ebenfalls für die auch von uns beobachteten homogenen Proliferationseigenschaften von Tumorzelllinien.

Bei der Arbeit mit über einen langen Zeitraum kultivierten Zelllinien muss man stets bedenken, dass sich die Zellen in ihren Eigenschaften bezüglich Tumorinitiierungspotential und Stammzellcharakteristiken stark von Tumorzellen aus frischem Tumorgewebe unterscheiden können. Viele Zelllinien verlieren über die Kulturzeit hinweg den hierarchischen Aufbau des Ursprungstumors<sup>55</sup>, wodurch sich die in unseren Versuchen beobachteten homogenen Proliferationseigenschaften der Zelllinie CT26 erklären würden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein Teil der in vitro kultivierten Zellen in vivo entdifferenzieren, so dass sich analog zum hierarchischen Aufbau des Ursprungstumors eine Tumorstammzellpopulation entwickelt, die das Tumorstammwachstum initiiert und aufrechterhält<sup>124</sup>. Im Gegensatz dazu ist die Hypothese möglich, dass die Zelllinie CT26 aus reinen tumorinitiierenden Zellen besteht. Durch die Implantation in vivo werden sie zur asymmetrischen Teilung angeregt und produzieren ausdifferenzierte Tochterzellen ohne Stammzeleigenschaften, die die Fähigkeit zur Teilung verloren haben. In diesem Falle wäre CD133 als Oberflächenmarker zur Charakterisierung potenzieller Tumorstammzellen jedoch ungeeignet, da er nur von einer kleinen Minderheit der CT26-Zellen exprimiert wird. Entsprechend dieser Theorie könnte vielmehr CD44 als möglicher Marker tumorinitiierender Zellen eine Rolle spielen, da er von nahezu der gesamten Zelllinie exprimiert wird.

Zusammenfassend kann man aus den Erkenntnissen zur Frequenz potentiell tumorinitiierender Zellen und CD133<sup>+</sup>-Zellen im Speziellen ersehen, dass der Anteil dieser Zellen in verschiedenen Tumorarten stark variiert. Möglicherweise ist dies Ausdruck tumorspezifischer onkogenetischer Signalwege, die in den unterschiedlichen Neoplasien wirken und so das Ausmaß der funktionellen Heterogenität und damit auch die Frequenz der tumorinitiierenden Zellen bestimmen<sup>55</sup>. Das der Tumorstammzelltheorie zu Grunde liegende Konzept bezieht sich demnach nicht auf die absolute Frequenz der tumorinitiierenden Zellen. Vielmehr impliziert dieses Modell, dass die Basis eines heterogen aufgebauten Tumors von einer eigenständigen Zellpopulation

gebildet wird, die auf Grund ihrer spezifischen Stammzeleigenschaften isoliert werden kann und zur Initiierung von Tumorwachstum in vivo fähig ist – während die restlichen Tumorzellen diese Eigenschaften nicht besitzen.

#### 4.2.4 Bedeutung von CD133 als Stammzellmarker gerechtfertigt?

Gemäß den Publikation von O'Brien et al.<sup>80</sup> und Ricci-Vitiani et al.<sup>95</sup> findet sich im Kolonkarzinom nur eine geringe Anzahl CD133<sup>+</sup>-Zellen (1,8% bis maximal 25%). Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse von Shemlkov et al.<sup>103</sup>, die mit Hilfe eines genetischen knock-in Mausmodells gezeigt haben, dass das Oberflächenprotein CD133 auf allen luminalen Epithelzellen des Kolons exprimiert wird. Darüber hinaus konnten sie mittels immunhistochemischer Färbung die Expression von CD133 auf allen epithelialen Zellen von murinen sowie humanen Kolonkarzinomen ermitteln, lediglich die nicht-epithelialen Zellkomponenten des Tumors, wie Stromazellen, inflammatorische und vaskuläre Zellen erwiesen sich negativ für CD133. Sie postulierten daher, dass die Unfähigkeit CD133-negativer Zellen zur Tumorinitiierung schlicht mit der Abwesenheit CD133-negativer Zellen im tatsächlichen Tumorgewebe zu begründen sein könnte. Die aufsehenerregendste Entdeckung stellte jedoch die Beobachtung dar, dass aus Metastasen isoliert sowohl CD133<sup>+</sup>- als auch CD133<sup>-</sup>-Zellen die Fähigkeit zur Tumorinitiierung in NOD/SCID-Mäusen besaßen. Hierbei kam es bei Implantation von CD133<sup>+</sup>-Zellen zur Formation von Tumoren, die sowohl eine CD133<sup>+</sup>- als auch CD133<sup>-</sup>-Population aufwiesen, während die CD133<sup>-</sup> metastatischen Zellen ausschließlich eine CD133<sup>-</sup>-Tumorphilpopulation hervorbrachten. Die CD133<sup>-</sup>-Zellen zeigten nach Implantation zudem ein aggressiveres und rascheres Wachstumsverhalten, woraus die Autoren die Schlussfolgerung zogen, dass die CD133<sup>-</sup> Population möglicherweise durch Entdifferenzierung und Herabregulierung der für reife Zellen spezifischen Marker entstanden waren.

Diese Beobachtungen stehen im scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen von O'Brien et al.<sup>80</sup> und Ricci-Vitiani et al.<sup>95</sup>, wobei jedoch die Möglichkeit besteht, dass sich die tumorinitiiierenden Zellen von Primärtumor und Metastasen in ihren Pathomechanismen und Regulationswegen entsprechend unterscheiden. Man muss zudem beachten, dass Shemlkov et al. die CD133-Expression auf Primärtumoren mittels Immunhistochemie und mikroskopischer Auswertung ermittelten, während in den

vorhergehenden Arbeiten zum Kolonkarzinom O'Brien<sup>80</sup> und Ricci-Vitiani<sup>95</sup> die Positivität für CD133 über Durchflusszytometrie bestimmten sowie zusätzlich die Fähigkeit der CD133<sup>+</sup>-Zellen zur Tumorgenerierung evaluierten – ein Punkt den Shmelkov et al. für seine in der Gesamtheit CD133<sup>+</sup>-Tumorphypopulation nicht nachgewiesen hatten. In retrospektiver Betrachtung der zwei oben genannten Studien zum Kolonkarzinom<sup>80,95</sup> kann man jedoch herauslesen, dass auch hier sowohl im normalen Kolongewebe als auch im Epithel des Kolonkarzinom zumindest in geringem Prozentsatz CD133 exprimiert wird. Daher wäre eine exaktere Definition der tumorinitiierenden Zellen des Kolonkarzinoms wohl der Hinweis auf eine Anreicherung für CD133, womit man entsprechende Zellen als CD133<sup>high</sup>, anstelle von CD133<sup>+</sup> bezeichnen sollte. Der feine, aber entscheidende Unterschied wäre damit nicht allein die Anwesenheit von CD133, sondern vielmehr die Anreicherung des Proteins auf der Zelloberfläche<sup>56</sup>. Hierbei sind weiterführende Studien notwendig, die über die Bedeutung einer Tumorzelle mit CD133<sup>high</sup>-Status in der Hierarchie des Kolonkarzinoms Aufschluss geben.

Einen weiteren Aspekt in der Isolierung CD133<sup>+</sup>-Zellen stellen die verwendeten Antikörper sowie verschiedene mögliche Bindungsstellen des Oberflächenproteins CD133 dar. Es existieren derzeit zwei verschiedenen humane Antikörper, AC133 und AC141, die beide glykosylierte Epitope auf CD133 binden. Dadurch stellt sich die Frage, ob die Expression von CD133 oder allein der Glykosylierungsstatus des spezifischen Epitops ausschlaggebend ist für die Tumorigenität der Zelle<sup>12</sup>. Zudem konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Epitope für AC133 und AC141 unabhängig von der Expression des CD133-Proteins oder der mRNA herabreguliert werden können<sup>24,36</sup> und die Gewebeverteilung der CD133-mRNA weitaus ausgedehnter ist als die Expression des AC133-Epitops<sup>72</sup>. Trotz gewisser Unklarheiten bezüglich der Zielepitope und Spezifität der Antikörper AC133 und AC141, erwiesen sie sich bis dato als extrem hilfreich in der Identifizierung potentieller Tumorstammzellen. Dennoch sollten die oben erwähnten Einschränkungen im Hinterkopf behalten werden, besonders wenn Versuche mit vermeintlich CD133-negativen Zellen, die über die Antikörper AC133 und AC141 isoliert wurden, durchgeführt und analysiert werden<sup>12</sup>.

#### 4.2.5 Weitere potentielle Tumorstammzellmarker

Da die Rolle des Oberflächenproteins CD133 als Tumorstammzellmarker weiterhin umstritten ist und selbst in einer CD133<sup>+</sup>-tumorigenen Subpopulation nicht jede CD133<sup>+</sup>-Zelle eine tumorinitiierende Zelle darstellt<sup>80</sup>, besteht die Notwendigkeit weitere Oberflächenantigene zur Identifizierung und genaueren Charakterisierung von Tumorstammzellen zu definieren.

Gemeinhin scheinen diese Moleküle für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften mitverantwortlich zu sein, sichern den Verbleib in der Nische und haben Einfluss auf die Protektionsmechanismen der Zellen<sup>3</sup>. Viele potentielle Stammzellen besitzen spezifische Schutzmechanismen gegenüber zytotoxischen Stoffen. Diese können effiziente enzymbasierte Entgiftungssysteme wie die Aldehyddehydrogenase (ALDH) beinhalten, die eine Resistenz gegenüber alkylierenden Reagenzien wie dem Cyclophosphamid verleiht<sup>109</sup>. Tatsächlich spricht das Vorhandensein einer Subpopulation an Zellen mit hoher ALDH-Expression für eine schlechte Prognose bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie<sup>20</sup>.

Ein weiterer gut beschriebener Schutzmechanismus beinhaltet die Expression von Mitgliedern der ABC-Transporter, einer großen Familie von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement mit einer ATP-bindenden Kassette (ABC) ausgestattet sind. Diese Proteine besitzen die Fähigkeit zur Hydrolyse von ATP, um Substrate aktiv gegen hohe Konzentrationsgefälle über eine Zellmembran zu transportieren, gewöhnlich vom Intra- zum Extrazellularraum<sup>69</sup>. Unter Berücksichtigung dieses Mechanismus gelang Goodell et al. die Isolation von hämatopoetischen Stammzellen auf der Grundlage ihrer Fähigkeit den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 aktiv auszustoßen<sup>42</sup>. Diese Zellen scheinen eine eigene Fraktion darzustellen, die als „side population“ (SP) bezeichnet wird und deren Phänotyp über den ABCG2-Transporter, einem Mitglied der ABC-Superfamilie definiert wird<sup>42</sup>. Interessanterweise konnte man feststellen, dass die SP-Fraktion sowohl in normalem Gewebe als auch in Tumoren oft der Stammzellpopulation entspricht<sup>5,51</sup>. Die Hypothese, dass die SP-Zellen, charakterisiert durch ihre Fähigkeit Hoechst 33342 auszustoßen, als Tumorstammzellpopulation angesehen werden können<sup>41</sup>, trifft jedoch nicht auf alle Gewebe zu<sup>74,114</sup> und scheint keine Rolle bei der Charakterisierung von Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms zu spielen<sup>4</sup>.

Auf Grund der vielversprechenden Funktion des Oberflächenantigens CD44 bei der Isolierung von Tumorstammzellen des Mammakarzinoms<sup>2</sup> untersuchten wir die Kolonkarzinomlinie CT26 ebenfalls auf dessen Expression. CD44 ist ein Glykoprotein, das an Zell-Zell-Interaktionen sowie der Adhäsion und Migration von Zellen beteiligt ist<sup>84</sup>. In unseren Untersuchungen wies die gesamte Zelllinie CT26 eine positive Expression des Oberflächenproteins CD44 auf (siehe Abbildung 3.4), so dass wir CD44 als spezifischen Marker einer tumorinitiierenden Subpopulation für die verwendete Zelllinie ausschlossen.

Dalerba et al. hingegen gelang die Isolierung einer tumorinduzierenden Subpopulation in humanem Kolonkarzinom auf Grundlage der Oberflächenproteine CD44 und EpCAM, einem epithelialen Zelladhäsionsmolekül. Hierbei betrug der Anteil der EpCAM<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamttumormasse in Durchschnitt zwischen 12% – 15%. Die Injektion von nur 200 – 500 der EpCAM<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup>-Zellen in NOD/SCID-Mäuse führte in den meisten Fällen zur Entwicklung eines Tumors, während selbst die Injektion von 10<sup>4</sup> EpCAM<sup>low</sup>/CD44<sup>-</sup>-Zellen kein Tumorwachstum hervorbrachte. Über eine systematische Evaluation des Oberflächenprofils der EpCAM<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup>-Zellen konnte die Arbeitsgruppe CD166 als weiteren Marker tumorinduzierender Zellen identifizieren, so dass sie die Kombination der Oberflächenantigene EpCAM/CD44/CD166 als vielversprechendste Grundlage zur Isolierung einer Tumorstammzellpopulation postulierten<sup>28</sup>.

Trotz intensiver Forschung im Bereich der Entstehungsmechanismen des kolorektalen Karzinoms gestaltete sich die Identifizierung weiterer potentieller Tumorstammzellmarker als äußerst schwierig. Als vielversprechender Marker normaler Stammzellen in den Krypten des Gastrointestinaltrakts gilt jedoch das von Barker et al. beschriebene Protein Lgr5, ein leucinreicher G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der über den Wnt-Signalweg gesteuert wird<sup>9</sup>. Über die Deletion von APC in Lgr5 knock-in Mäusen konnte die Arbeitsgruppe elegant zeigen, dass sich innerhalb weniger Tage eine dysplastische Transformation der Stammzellen in der Krypte abspielte und diese als tumorinitiierende Population in der Entwicklung des Kolonkarzinoms fungieren können<sup>8</sup>. Zusammen mit der Beobachtung, dass in fortgeschrittenen Stadien des kolorektalen Karzinoms eine stark erhöhte Expression von Lgr5 vorzufinden ist<sup>68</sup>, erscheint Lgr5 als äußerst aussichtsreicher Marker zur Isolierung von Tumorstammzellen sowie als Angriffspunkt einer gezielten Tumorthherapie.

Weitere potentielle Marker für normale Stammzellen des Gastrointestinaltrakts beinhalten Bmi-1<sup>99</sup>, ein Mitglied der Polycomb Genfamilie, das initial als Leukämie-induzierendes Onkogen beschrieben wurde<sup>11</sup> sowie Musashi-1, ein RNA-Bindungsprotein, das einen positiv regulierenden Effekt auf den Notch-Signalweg ausübt<sup>75,88</sup>. In wie weit diese Oberflächenproteine jedoch zur Identifizierung von Stammzellen des Kolonkarzinoms herangezogen werden können, ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Studien.

Als weiterer potentieller Tumorstammzellmarker hat der Chemokinrezeptor CXCR4 in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen, unter anderem auch in der Kombination mit dem Oberflächenprotein CD133. Hermann et al. gelang es im Pankreaskarzinom eine CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>-Subpopulation zu identifizieren, die eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapie aufwies und ausschlaggebend für die Metastasierung der Tumore war<sup>46</sup>. Für das Nierenzellkarzinom wurde ebenfalls eine CXCR4<sup>+</sup>-Subpopulation beschrieben<sup>125</sup>, deren Expression mit einer ungünstigen Prognose einhergeht und daher als möglicher Angriffspunkt einer gezielten Therapie in Betracht kommt<sup>29</sup>.

### 4.3 Mausmodell

Um Aufschlüsse über die Proliferationseigenschaften der Kolonkarzinomlinie CT26 in vivo zu erhalten, etablierten wir ein Tumormodell in Nacktmäusen. Die subkutane Injektion von 100.000 CT26-Zellen in die Flanke der Nacktmäuse führte hierbei in allen Fällen zum Tumorwachstum (siehe Abschnitt 3.1.2).

Die Nacktmaus (nu/nu) zeichnet sich durch ein Fehlen des Thymus aus, wodurch die im Thymus stattfindende Reifung der Lymphozyten ausbleibt. Diese gravierende Schwächung des Immunsystems führt zum Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen bei Implantation von allogenem oder xenogenem Material<sup>96</sup>, wie sie in unseren Versuchsreihen durchgeführt wurde. Weitere Gründe für die Auswahl dieser Spezies waren der Umstand, dass wir die Versuchstiere aus einer etablierten Nacktmauszucht der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg beziehen konnten sowie die Haltung unter standardisierten Bedingungen im Tierstall des Universitätsklinikums Regensburg.

Ein Nachteil des verwendeten Nacktmausmodells stellt allerdings die Tatsache dar, dass diese Spezies keine vollständige Immunsuppression besitzt. Trotz des Fehlens der T-Lymphozyten weisen die Nacktmäuse neben intakten B-Lymphozyten weitere relevante Bestandteile vor allem der unspezifischen Immunsuppression auf, darunter NK (natürliche Killer)-Zellen, Makrophagen sowie das Komplementsystem.

Als alternatives Modell wurde eine Maus mit der SCID (severe combined immunodeficiency)-Mutation generiert, die sich durch das Fehlen der B- und T-Lymphozyten auszeichnet. Über die Kombination mit einer Maus des NOD (nonobese diabetic)-Typs wurde die NOD/SCID-Maus gezüchtet, bei der das Fehlen der B- und T-Lymphozyten durch eine Abwesenheit von NK-Zellen ergänzt wird. Die NOD/SCID-Mäuse wurden in einem Großteil der Literatur als Standardmodell zur Verifizierung der Tumorstammzelltheorie über allogene oder xenogene Transplantationsexperimente beschrieben<sup>2,17,80,104</sup>.

In der Zwischenzeit konnte jedoch ein weiterer Mausstamm entwickelt werden, der im Vergleich zu den NOD/SCID-Mäusen eine weitaus stärkere Immunsuppression aufweist. Hierzu wurden NOD/SCID-Mäuse mit einem zusätzlichen knock-out der IL2-Rezeptor  $\gamma$ -Kette versehen, wodurch das Fehlen der B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen durch Funktionsdefizite in Makrophagen und dem Komplementsystem ergänzt wird. Dieses NSG- oder NOG-Mäuse (NOD/Shi-scid, IL-2R  $\gamma$ (null)) stellen momentan den Goldstandard für Transplantationsexperimente an Mäusen dar<sup>16</sup>.

#### 4.3.1 Erhöhter Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen in vivo

Die durch die Kolonkarzinomlinie CT26 in der Nacktmaus induzierten Tumore wurden auf die Expression des Oberflächenproteins CD133 analysiert, wobei sich ein Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen von 1,3% ergab (siehe Abbildung 3.11). In der Zellkultur wurde im Gegensatz dazu ein Prozentsatz CD133<sup>+</sup>-Zellen von 0,2% bestimmt. Die Erhöhung der Fraktion CD133<sup>+</sup>-Zellen um etwa 1,1% mag zum einen daran liegen, dass das analysierte Tumorgewebe durch epitheliale Zellen der Nacktmaus, die ebenfalls CD133 exprimieren, verunreinigt war. Andererseits ist es denkbar, dass sich die Subpopulation der CD133<sup>+</sup>-Zellen beeinflusst durch die Umweltfaktoren, die in vivo auf die Zellen einwirken und möglicherweise eine Art Nische bilden, durch symmetrische Teilung



vermehrt und somit eine solide Basis für die Initiierung und Erhaltung des Tumors darstellt<sup>124</sup>.

Ricci-Vitiani et al. stellten in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fest, dass der Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen von initial 5% im Ursprungstumor im Rahmen einer seriellen Transplantation auf 15% (Primärtumor) bzw. 25% (Sekundärtumor) stetig anstieg<sup>94</sup>.

#### 4.3.2 Frequenz tumorinitiierender Zellen in vivo

Zur Berechnung der Proliferationsfrequenz der CT26-Zellen in vivo wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, in deren Rahmen in Zehnerpotenzen aufsteigend je vier mal  $10$  bis  $10^5$  Zellen subkutan in die Flanken einer Nacktmaus injiziert wurden. Anhand der entstandenen Tumore konnte mit Hilfe der L-Calc™ Limiting Dilution Software (Stemcell Technologies, Grenoble, France) die Frequenz der tumorinduzierenden Zellen auf  $1 : 9.100$  Zellen bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.3.2, Tabelle 3.1). Über die serielle Transplantation dieser in vivo generierten Tumore wurde eine weitere Verdünnungsreihe erstellt, aus der eine Frequenz der tumorinitiierenden Zellen von  $1 : 133.000$  Zellen errechnet werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.2, Tabelle 3.2). Insgesamt ergab sich hierbei eine durchschnittliche Frequenz tumorinitiierender Zellen von etwa  $1 : 71.000$ .

O'Brien et al. führten eine ähnliche Verdünnungsreihe durch und passagierten den Primärtumor in Zweit- und Drittempfängermäuse. Aus diesen Ergebnissen errechneten sie eine durchschnittliche Frequenz der tumorinitiierenden Zellen von  $1 : 57.000$  Zellen<sup>80</sup>. Auf diese Weise konnten sie zeigen, dass wie bereits für das Mammakarzinom und Hirntumore beschrieben, auch im Kolonkarzinom nur eine geringe Anzahl an Tumorzellen in der Lage war Tumorwachstum zu induzieren. Zur Untermauerung dieser Behauptung führten sie eine Aufreinigung der Tumormasse in CD133<sup>+</sup>- und CD133<sup>-</sup>-Zellen durch und injizierten diese Fraktionen wiederum in NOD/SCID-Mäuse. Die Gruppe der CD133<sup>-</sup>-Zellen konnten selbst bei hohen Injektionsdosen von bis zu  $250.000$  Zellen kein Tumorwachstum hervorrufen, während bereits  $500$  CD133<sup>+</sup>-Zellen konstant zur Formation eines Tumors führten<sup>80</sup>.

Um anhand der Proliferationsfrequenz in vivo auf die Existenz von tumorinitiierenden Zellen in der Kolonkarzinomlinie CT26 schließen zu können, müsste im Weiteren wie

oberhalb beschrieben ebenfalls eine Aufreinigung in CD133<sup>+</sup>- und CD133<sup>-</sup>-Zellen erfolgen und deren Fähigkeit zur Tumormutation in vivo evaluiert werden.

Die Beobachtung, dass hohe Zellzahlen einer unfractionierten Tumormasse benötigt werden, um Tumorstadium in vivo zu erzeugen, mag einerseits an der Existenz einer geringen Population tumorinitiierende Zellen liegen, andererseits jedoch ebenso durch die feindliche Umgebung im murinen Gewebe bedingt sein<sup>69</sup>. Speziell bei subkutaner Injektion der Tumorzellen entspricht die Platzierung der Zellen nicht dem natürlichen Ursprungsort des Tumors, so dass die Zellen außerhalb ihrer biologischen Nische möglicherweise nur in geringem Maße spezifische Signale zum Überleben und Wachstum erhalten. Des Weiteren sind die Tumorzellen selbst in immunsupprimierten Mäusen den verbliebenen Kräften der Immunabwehr ausgesetzt<sup>16</sup>. Dies scheint von nicht zu vernachlässigender Bedeutung zu sein, wenn man die Ergebnisse histokompatibler<sup>54,124</sup> oder in NOG-Mäuse<sup>90</sup> transplantierte Tumorzellen betrachtet. Die Frequenz tumorinitiierender Zellen im humanen Melanom wurde über Xenotransplantation in NOD/SCID-Mäuse auf 1 in 10<sup>6</sup> Zellen bestimmt<sup>101</sup>, durch die Verwendung von NOG-Mäusen konnte jedoch selbst für einzelne Zellen des humanen Melanoms die Induzierung von Tumorstadium nachgewiesen werden<sup>90</sup>. Zusätzliche Optimierungen der Transplantationstechniken, wie orthotope Transplantation der Tumorzellen sowie der Zusatz humaner Stromazellen wurden in letzter Zeit vermehrt herangezogen, um die Sensitivität und klinische Genauigkeit des Mausmodells zu verbessern<sup>16</sup>.

Weiterhin stellten wir fest, dass die aus dem Primärtumor isolierten Zellen in Zweitempfängermäusen nicht nur weniger Tumore hervorbrachten, diese waren auch kleiner und entstanden später (siehe Abschnitt 3.3.3). Dies könnte darauf hindeuten, dass die CT26-Zellen im Verlauf der seriellen Transplantation durch asymmetrische Teilung ausdifferenzierte Tochterzellen hervorbringen, die ihre stammzelltypischen Eigenschaften und somit auch die Fähigkeit zur Tumorstadium verloren haben. Bei der Erstimplantation der CT26-Zelllinie handelte es sich um eine reine Zellkultur, die ausschließlich aus Zellen der Kolonkarzinomlinie CT26 bestand. Die aus dem Tumor in vivo gewonnen Zellen wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch durch Fibroblasten, Stromazellen sowie vaskuläre und inflammatorische Zellen verunreinigt. Zusätzlich wurden die Tumorzellen im Rahmen der Aufreinigung und Weitertransplantation hohem mechanischem und metabolischem Stress ausgesetzt, was zu einem nicht

unerheblichen Verlust von Karzinomzellen mit der Fähigkeit zur Tumorinitiation geführt haben könnte.

Ricci-Vitiani et al. stellten durch ihre Versuche im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fest, dass während der in vivo Passagen die potentiell tumorinduzierenden CD133<sup>+</sup>-Zellen ihr tumorigenes Potential nicht verloren, sondern sich im Gegenteil durch erhöhte Aggressivität auszeichneten, indem sie ein rascheres Tumorwachstum sowie einen erhöhten Anteil CD133<sup>+</sup>CK20<sup>-</sup>-Zellen aufwiesen<sup>95</sup>.

#### 4.4 Anreicherung CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen

Ein gravierendes Problem in der Therapie praktisch aller Tumore stellt die Resistenz einiger Tumorzellen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung dar, so dass nach scheinbar vollständiger Eradikation des Tumors nicht selten das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen beobachtet wird. Die Tumorstammzelltherapie bietet eine plausible Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen, indem ein geringer Prozentsatz an Tumorzellen ausgestattet mit stammzellähnlichen Eigenschaften den toxischen Effekten etablierter Antitumorthérapien entgehen kann. Diese Zellen führen im Verlauf zur Entstehung von Rezidivtumoren, die sich als hochgradig resistent gegenüber weiterer Therapie erweisen, da sie durch die initiale Therapie bereits positiv selektioniert worden waren<sup>76</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die CD133<sup>+</sup>-Subpopulation der Kolonkarzinomlinie CT26 durch Bestrahlung oder Chemotherapie anreichern ließe. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen 5-FU konnte eine signifikante Anreicherung der CD133<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich tendenziell eine höhere Resistenz der CD133<sup>+</sup>-Zellen bei Bestrahlung mit hohen Dosen (siehe Abschnitt 3.2.4, Abbildung 3.10). Die verstärkte Resistenz gegenüber einem Chemotherapeutikum unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der CD133<sup>+</sup>-Zellfraktion um Tumorstammzellen handelt, die durch ihre geringe Proliferationsrate weniger Angriffspunkte für die das Zellwachstum hemmenden Chemotherapeutika bieten und/oder über spezifische Stammzeleigenschaften über eine effektive Abwehr gegenüber toxischen Stoffen verfügen.

Liu et al. erbrachten durch ihre Versuche an Glioblastomzellen erstmals den Beweis, dass CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen eine signifikante Resistenz gegenüber ausgewählten Chemotherapeutika besaßen, darunter Temozolomid, Carboplatin, Paclitaxel und Etoposid. Die erhöhte Resistenz im Vergleich zu CD133<sup>-</sup>-Tumorzellen lässt sich möglicherweise durch die vermehrte Expression verschiedener anti-apoptotischer Proteine (u.a. bcl-2, FLIP, c-IAP2) sowie des ABC-Transporters ABCG2 auf den CD133<sup>+</sup>-Zellen erklären<sup>63</sup>.

Einige Studien haben die Bedeutung der Hochregulierung eines weiteren Mitglieds der ABC-Transporterfamilie, des ABCG5-Proteins in CD133<sup>+</sup>-Zellen hervorgehoben. Frank et al. konnten zeigen, dass frisch isoliertes humanes Melanomgewebe hohe Level an CD133 und ABCG5 exprimiert und sich CD133<sup>+</sup>/ABCG5<sup>+</sup>-Melanomzellen als resistent gegenüber der Behandlung mit Doxorubicin erwiesen. Die Autoren postulierten ABCG5 daher als möglichen Marker für die Chemoresistenz von Tumorzellen und sinnvollen Angriffspunkt einer gezielten Therapie<sup>39</sup>. Allgemein könnte die Expression von ABC-Transportern Tumorstammzellen dazu befähigen, in der Chemotherapie eingesetzte Medikamente effizient und rasch wieder aus der Zelle zu befördern und auf diesem Wege zu Rezidiven sowie Resistenzen gegenüber der Chemotherapie führen.<sup>69</sup>

Auch die Resistenz CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen gegenüber Bestrahlung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Bao et al. zeigten, dass CD133<sup>+</sup>-Zellen des Glioblastoms nach Bestrahlung deutlich höhere Resistenzlevel aufwiesen, die in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von CD133 standen<sup>7</sup>.

Die Resistenz CD133<sup>+</sup>-tumorinitiierender Zellen gegenüber einer Anti-Tumorthherapie<sup>63</sup> wurde von weiteren Arbeitsgruppen sowohl für Chemotherapie<sup>60,65</sup> als auch für Bestrahlung<sup>45</sup> nachgewiesen und spricht für die Hypothese, dass diese Subpopulation über stammzellspezifische Eigenschaften verfügt. Da die Funktion von CD133 jedoch noch weitgehend unbekannt ist, ist nicht klar, ob CD133 nur ein Marker resistenter Zellen darstellt oder ob eine hohe Expression von CD133 auf tumorinitiierenden Zellen zur Therapieresistenz beitragen könnte<sup>76</sup>.

## 4.5 Klinischer Bezug

Da der Tumorstammzelltheorie immer größere Bedeutung in unserem Verständnis der Tumorentstehung zukommt, hat dies grundlegende und tiefgreifende Auswirkungen auf die Therapie von Tumoren und insbesondere deren Metastasen. Momentan werden alle Tumorzellen, obwohl phänotypisch unterschiedlich, behandelt als hätten sie ein unbegrenztes Proliferationspotential und könnten die Fähigkeit zur Metastasierung erwerben. Bereits vor vielen Jahren hat man jedoch festgestellt, dass eine kleine Anzahl disseminierter Tumorzellen an weit vom Primärtumor entfernten Stellen entdeckt werden können, die Patienten dennoch keine Metastasen entwickelten<sup>97</sup>. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass das Immunsystem hoch effektiv disseminierte Tumorzellen abtötet, bevor sie einen nachweisbaren Tumor formen können. Als andere Möglichkeit kann man die Hypothese heranziehen, dass der Mehrzahl der Tumorzellen die Fähigkeit zur Generierung eines neuen Tumors fehlt, so dass die Bildung von Metastasen nur der Subpopulation der Tumorstammzellen vorbehalten ist.

Wenn man davon ausgeht, dass das Wachstum solider Tumore und deren Metastasen von Tumorstammzellen unterhalten werden, kann man das Versagen vieler Therapien auf ihre Unfähigkeit zurückführen Tumorstammzellen effektiv zu vernichten. Wie oberhalb aufgezeigt, scheinen sich tumorinitiierende Zellen bzw. Tumorstammzellen analog zu normalen Stammzellen zudem durch eine höhere Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie auszuzeichnen. Daher ist es wichtig Therapien zu entwickeln, die nicht nur die proliferierenden Zellen, sondern auch die Stammzellen eines Tumors angreifen, um eine definitive Heilung zu erreichen. Zurzeit existierende Therapien zielen im Gegensatz dazu hauptsächlich darauf ab, die Hauptmasse des Primärtumors sowie dessen Metastasen zum Schrumpfen zu bringen. Diese Effekte sind jedoch oft nur vorübergehend und Rezidive der meisten metastasierenden Tumore werden häufig beschrieben, so dass es trotz aggressiver Therapie zu keiner nennenswerten Lebensverlängerung des Patienten kommt<sup>66,92</sup>.

Derartige Beobachtungen treffen insbesondere auf das Kolonkarzinom zu. Vor allem im metastasierten Stadium sind die Überlebensraten der Patienten trotz scheinbar gutem Ansprechen auf die Chemotherapie extrem niedrig. Die 5-Jahres-Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms beträgt in den westlichen Ländern 93% im UICC Stadium I, über 60% bei regional begrenztem Tumorwachstum in den Stadien II-III und sinkt im

Stadium IV bei Vorliegen von Fernmetastasen drastisch auf unter 10% ab<sup>1,81</sup>. Da der venöse Abfluss des Intestinaltrakts über das Pfortadersystem läuft, stellen Lebermetastasen gewöhnlich die erste Manifestation hämatogener Dissemination des Tumors dar, gefolgt von Metastasen in Lunge, Knochen und Gehirn. Das Vorhandensein von Metastasen ist von entscheidender Bedeutung, da es sowohl den klinischen Verlauf als auch die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in erster Linie bestimmt. Etwa 20% der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen auf, 30% - 60% entwickeln im weiteren Verlauf hepatische Filiae<sup>53</sup>. Das kolorektale Karzinom stellt somit nicht nur eine der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland dar, sondern weist auch eine der höchsten tumorbedingten Mortalitätsraten auf<sup>52</sup>.

Aus diesem Grund ist es erforderlich neue gezielte Therapien zu entwickeln, die das Kolonkarzinom an seinem Ursprungsort bekämpfen und somit die Entwicklung von Metastasen oder Rezidiven verhindern. Die Tumorstammzelltheorie eröffnet hierbei neue Ansatzmöglichkeiten, da die gezielte Eradikation der tumorinitiierenden Zellen höhere und insbesondere langfristige Ansprechraten bzw. sogar eine Heilung metastatischer Tumore in Aussicht stellt. Grundsätzlich stehen zwei Ansatzmöglichkeiten zur Elimination von Tumorstammzellen zur Verfügung: Einerseits ist es denkbar die Differenzierung von Tumorstammzellen herbeizuführen, so dass sie ihre stammzellspezifischen Eigenschaften verlieren, andererseits könnten sie über gezielte Angriffe auf spezifische Marker oder Signalwege direkt abgetötet werden<sup>66</sup>.

Die Differenzierungstherapie beruht darauf Tumorstammzellen aus ihrem Stammzellstatus zu lösen, indem sie durch bestimmte Signale zur Differenzierung gezwungen werden. Durch diesen Prozess würden sie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren, dem Tumor wäre somit seine Grundlage zur Selbsterhaltung entzogen. Zwei Kategorien an Antitumormedikamenten konnten bislang identifiziert werden, die auf die Differenzierung von Tumorzellen Einfluss haben: Medikamente, die epigenetische Veränderungen in Tumoren hervorrufen und die Retinsäure (Vitamin A), die bis dato als einzige Substanz in der Klinik Anwendung findet. Vitamin A und seine Derivate beeinflussen die Differenzierung und Proliferation epithelialer Zellen und können den Prozess der malignen Entartung über die Modulation von Transduktionssignalen umkehren<sup>66</sup>. Durch den Einsatz der all-trans-Retinsäure (ATRA) in Kombination mit Chemotherapie bei akuter promyelozytärer Leukämie ist diese zu

einer heilbaren Krankheit geworden. Derzeit wird bei ca. 90% der neu diagnostizierten Patienten mit akuter promyelozytäre Leukämie eine komplette Remission erreicht, während bei über 70% sogar eine Heilung mit der ATRA-Therapie erzielt werden kann<sup>82</sup>.

Piccirillo et al. konnten das Prinzip der Differenzierungstherapie erfolgreich an einem Glioblastomxenograft etablieren, indem sie Tumormodelle des Glioblastoms in vitro und in vivo mit BMP4 (bone morphogenic protein 4) behandelten, woraufhin die Tumore ihre Fähigkeit zur Bildung intrazerebraler Xenografte in immunsupprimierten Mäusen verloren. Die Exposition der Glioblastomzellen gegenüber BMP4 führte zu einer Verringerung ihrer Proliferationsfähigkeit sowie zu einer erhöhten Expression neuraler Differenzierungsmarker. Interessanterweise zeigte sich kein negativer Effekt auf die Überlebensrate der Zellen. Jedoch wurde einer Verringerung der CD133<sup>+</sup>-Population um 50% beobachtet, die mit der verminderten klonalen Fähigkeit des Tumors korrelierte<sup>87</sup>. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Stammzellpopulation eines Tumors sehr wahrscheinlich noch auf biologische Differenzierungssignale anspricht. Dies könnte in Zukunft zur Entwicklung neuer, nicht-toxischer Therapien führen, die die Differenzierung maligner Gewebe zum Ziel haben<sup>79</sup>.

Ein exzellentes Beispiel für den gezielten Angriff auf Tumorstammzellen stellt die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib dar. Die CML ist das Paradebeispiel einer Stammzellerkrankung, die auf der Translokation t(9;22)(q34;q11) zwischen dem Chromosom 9 und 22 beruht und zur Entstehung des sog. Philadelphia-Chromosoms führt. Eine geringe Zellpopulation, die diese genetische Aberration enthält und den Phänotyp hämatopoetischer Stammzellen besitzt, ist über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in der Lage alle hämatopoetischen Zelllinien auszubilden. Das durch die Translokation entstandene Fusionsprodukt BCR-ABL, eine Tyrosinkinase, ist hauptverantwortlich für die Entstehung der CML. Imatinib ist ein spezifischer Hemmstoff, der die Aktivität der Tyrosinkinase ABL in den erkrankten Zellen blockiert und damit die krankhaft gesteigerte Vermehrung der mutierten hämatopoetischen Stammzellen unterdrückt<sup>16</sup>. Eine solch gezielte und effektive Therapie würde auch in der Behandlung des Kolonkarzinoms zu großen Fortschritten in

der Behandlung führen und es wäre wünschenswert, einen derartig spezifischen Angriffspunkt isolieren zu können.

Kürzlich an CD133<sup>+</sup>-Kolonkarzinomzellen durchgeführte Versuche machen jedoch Hoffnung auf die Identifizierung eines spezifischen Angriffspunktes. Todaro et al. zeigten, dass die CD133<sup>+</sup>-Zellpopulation Interleukin 4 (IL4) als autokrinen Wachstumsfaktor produzierte, der das Überleben des Tumors über die Hochregulierung von antiapoptotischen Genen begünstigte. In einem Mausmodell, dass über subkutane Injektion CD133<sup>+</sup>-Zellen eines humanen Kolonkarzinom entstand, konnte die Behandlung mit IL4Ra-Antagonisten oder einem anti-IL4 neutralisierendem Antikörper die Effektivität konventioneller Chemotherapie deutlich steigern, indem die Population der Tumorstammzellen gezielt angegriffen wurde<sup>113</sup>.

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt für eine gezielte Therapie des Kolonkarzinoms stellt die Entwicklung eines Antikörpers dar, der spezifisch einen ausschließlich von Tumorstammzellen exprimierten Oberflächenmarker bindet<sup>69</sup>. Für den Adhäsionsrezeptor CD44 wurde gezeigt, dass verschiedene Splicing Varianten des Oberflächenproteins von Tumorstammzellen und normalen Stammzellen exprimiert werden<sup>70</sup>. Diese Unterschiede könnten einen potentiellen Angriffspunkt einer Antikörper-basierten Therapie darstellen<sup>66</sup>.

Die Proliferation von Tumorstammzellen ist mit großer Wahrscheinlichkeit an die Deregulierung von Signalwegen gekoppelt, die auch in normalen Stammzellen für die Selbsterneuerung verantwortlich sind. Darunter fallen die Wnt-/β-catenin-, PTEN-, Notch- und Hedgehog-Signalwege sowie Produkte der Bmi-1 Genfamilie. Inhibierung einzelner Signalproteine, die unabdingbar für die Erhaltung der Tumorstammzellen sind, erscheint als weiterer vielversprechender Ansatzpunkt. Die Blockade der SMO-Aktivität, ein Protein, dass die Aktivierung von Bmi-1 beeinflusst, mit dem Antagonisten Cyclopamine wurde als hoch effektive Strategie gegen bestimmte Tumore beschrieben<sup>69</sup>.

Abgesehen von den Signalwegen, die für die Selbsterneuerung und Proliferation von Tumorstammzellen verantwortlich sind, existiert eine Vielzahl weiterer potentieller molekularer Angriffspunkte. Da die Expression von ABC-Transportern in vielen Tumoren bereits nachgewiesen wurde und wohl in Zusammenhang mit der Chemoresistenz der tumorinitiierenden Zellen steht, scheint die spezifische Identifizierung und konsekutive Ausschaltung der ABC-Transporter-Aktivität ein



vielversprechender Ansatz zur Überwindung der Therapieresistenz vieler Tumore zu sein<sup>69</sup>.

Da die Bedeutung der Stammzellnische immer besser verstanden wird, scheint nun auch der Angriff auf dieses Element der Stammzellbiologie möglich. Für solide Tumore hat sich vor allem die vaskuläre Nische als besonders bedeutsam herausgestellt. Die Therapie mit anti-angiogenen Substanzen zur Reduktion der Tumormasse über die Unterbrechung der Blutzufuhr ist nicht neu, jedoch besteht die Hoffnung, dass derartige Medikamente auch zur Zerstörung der Interaktionen zwischen Tumorstammzellen und vaskulärer Nische beitragen könnten<sup>40,69</sup>.

DNA- und Microanalysen des Tumorgewebes wurden in letzter Zeit angewandt, um Subtypen von Tumoren zu identifizieren. Auf diese Weise sollen Diagnose und Therapie verbessert werden, indem eine Vorhersage über das Ansprechen des Tumors auf die Therapie gemacht werden kann<sup>94</sup>. Die Genexpression normaler Stammzellen scheint sich zudem erheblich von der Genexpression ihrer differenzierteren Nachkommen zu unterscheiden. Daher ist es möglich, dass die Analyse der Genexpression tumorinduzierender Zellen neue diagnostische Marker und somit neue therapeutische Angriffspunkte hervorbringt<sup>66</sup>.

Die klinische Relevanz von Tumorstammzellen muss trotz aller vielversprechenden Ergebnisse noch bewiesen werden. Es wird jedoch weithin angenommen, dass zur Verhütung von Rezidiven und effektiven Bekämpfung von Metastasen die gezielte Therapie tumorinitiierender Zellen ein essentieller Bestandteil der Tumorbehandlung darstellt. Falls dies gelingt, könnten neue tumorstammzell-spezifische Medikamente darüber hinaus die Toxizität reduzieren, die mit derzeitigen proliferationshemmenden Chemotherapien verbunden ist<sup>16</sup>.

## 4.6 Fazit

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Kolonkarzinomlinie CT26 in vitro eine geringe CD133<sup>+</sup>-Subpopulation besitzt, jede Zelle jedoch unabhängig von der CD133-Expression in vitro zur Teilung fähig ist. Bei Injektion in Nacktmäuse konnte eine Erhöhung der CD133<sup>+</sup>-Subpopulation beobachtet werden und eine definierte Frequenz tumorinitiierender Zellen bestimmt werden. Die Ergebnisse der in vivo Versuchen weisen somit auf einen hierarchischen Aufbau des Tumors entsprechend der Tumorstammzelltheorie hin. Für die Existenz einer CD133<sup>+</sup>-tumorinduzierenden Subpopulation spricht die Erkenntnis, dass der Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen über hohe Dosen an Bestrahlung und Chemotherapie angereichert werden konnte.

Das Konzept der Heterogenität eines Tumors sowie die Hypothese, dass nur eine geringe Fraktion an Tumorzellen die Fähigkeit zur Proliferation besitzt, ist schon seit vielen Jahrzehnten bekannt<sup>49</sup>. Erst in den letzten 15 Jahren wurden jedoch rapide Fortschritte in der Identifizierung und Isolierung von sog. Tumorstammzellen sowohl in hämatopoetischen als auch soliden Tumormodellen erzielt. Eine zunehmende Zahl an Belegen spricht inzwischen allerdings dafür, dass das Modell einer Stammzellhierarchie nicht für alle Tumorarten zutreffend ist. Andererseits scheinen Tumorstammzellen zumindest in manchen Neoplasien häufiger vorzukommen als ursprünglich angenommen. Tatsächlich mag die absolute Frequenz von Tumorstammzellen nicht allein von der Tumorart oder der Ursprungszelle abhängen, sondern über spezifische onkogenetische Veränderungen beeinflusst werden, die die Stammzeleigenschaften einer Neoplasie regulieren<sup>48</sup>.

Zusammenfassend scheint das Tumorstammzellmodell eine weitaus größere Komplexität aufzuweisen als dies initial ersichtlich war. Um vergleichbare und präzise Ergebnisse zu erzielen, müssen einerseits die Modelle zur Evaluierung der Selbsterneuerungsfähigkeit von Tumorstammzellen auf ihre Sensitivität hin optimiert werden. Andererseits müssen Faktoren wie Umwelteinflüsse, epigenetische Veränderungen und Signalwege auf ihre Rolle hinsichtlich der Regulierung und Erhaltung stammzellspezifischer Eigenschaften untersucht werden, um gezielt neue therapeutische Angriffspunkte gegen tumorinitiierende Zellen entwickeln zu können<sup>16</sup>. Darüber hinaus darf jedoch nicht vergessen werden, dass Tumorstammzellen nur einen von vielen möglichen Angriffspunkten einer Tumorthherapie darstellen und

möglicherweise erst in Kombination mit bereits etablierten oder neu entwickelten Behandlungsformen optimal bekämpft werden können.

Selbst wenn die Entdeckung eines spezifischen Angriffspunktes von Tumorstammzellen die Wissenschaft momentan noch vor eine große Herausforderung stellt, wäre eine derartige Therapie unbestreitbar ein gewaltiger Durchbruch in der Bekämpfung von Tumoren, vor allem solcher mit hohem Metastasierungspotential wie dem Kolonkarzinom.

## **5 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Modell der Tumorstammzellen im Kolonkarzinom. In Deutschland beträgt das Lebenszeitrisiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken 6%, womit es zu den häufigsten Tumorentitäten zählt. Insbesondere im Stadium der Metastasierung ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit unter 10% sehr niedrig. Aus diesem Grund ist es ein hohes Anliegen neue, gezielte Therapien zu entwickeln, die das Kolonkarzinom an seinem Ursprungsort bekämpfen und somit die Entwicklung von Metastasen oder Rezidiven verhindern sollen. Mit der Formulierung der Tumorstammzelltheorie eröffnen sich gänzlich neue Optionen in der Therapie des Kolonkarzinoms.

Die Tumorstammzelltheorie geht davon aus, dass ein Tumor einen hierarchischen Zellaufbau aufweist. Nur eine geringe Anzahl langsam proliferierender sog. Tumorstammzellen halten das Wachstum des Tumors aufrecht. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung. Es wird angenommen, dass sie die Hauptmasse des Tumors bestehend aus ausdifferenzierten Tochterzellen hervorbringen. Die klassischen Therapieansätze zielen hauptsächlich auf die Vernichtung schnell proliferierender Tumorzellen und eine rasche Verringerung des Tumolvolumens ab. Die Population der tumorinitiierenden Zellen wird mit diesen Therapien möglicherweise nicht tangiert und kann sogar eine Resistenz durch positive Selektionierung entwickeln. Ausgehend von diesem Ansatz wurde die Hypothese untersucht, ob diese tumorinitiierenden Zellen über eine vorrangige Expression von Stammzeleigenschaften verfügen, wodurch sie im Gegensatz zur Haupttumormasse eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aufweisen.

Als Tumormodell für diese Arbeit wurde die murine Kolonkarzinomlinie CT26 ausgewählt. Zur Identifizierung einer möglichen tumorinduzierenden Subpopulation erfolgte die Untersuchung der Zelllinie CT26 auf die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD133, zwei vielversprechenden Stammzellmarkern für das Kolonkarzinom. Bei der Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte die gesamte Zelllinie eine positive Expression des Oberflächenmarkers CD44. Dahingegen konnte eine geringe, jedoch stabile CD133-positive Subpopulation identifiziert werden, die 0,2% der Gesamtpopulation ausmachte. Um Aufschlüsse über das Proliferationsverhalten der Kolonkarzinomlinie in vitro zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, in

der jede einzelne Zelle die Fähigkeit zur Initiation von Tumorwachstum in vitro zeigte. Übereinstimmende Ergebnisse lieferte eine Färbung der Zelllinie mit CFSE, die bestätigte, dass sich jede Zelle unter Standardkulturbedingungen teilte. Im Folgenden wurde untersucht inwiefern die Zelllinie zur Generierung von Tumoren in Nacktmäusen fähig ist. Hierzu wurde eine definierte Anzahl der CT26-Zellen subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert, wobei eine Anzahl von 100.000 Zellen stets zu Tumorwachstum führte. Die Fraktion CD133-positiver Zellen dieser Tumore stieg hierbei auf 1,3% im Gegensatz zu 0,2% aus der in vitro Kultur an. Zur Berechnung der Proliferationsrate in vivo wurde eine Verdünnungsreihe von 100.000 Zellen in Zehnerpotenzen auf 10 Zellen absteigend in Nacktmäuse injiziert, wobei die Frequenz tumorinduzierender Zellen 1 : 9.100 betrug. Die Zellen dieser in vivo generierten Tumore wurden wiederum in einer Verdünnungsreihe in Nacktmäuse injiziert, hierbei ergab sich eine Frequenz der tumorinitiierenden Zellen von 1 : 133.00. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass diese reisolierten Zellen nicht nur weniger Tumore hervorbrachten, diese waren auch kleiner und entstanden später. Zuletzt wurde untersucht, ob die CD133-positive Subpopulation im Vergleich zu den CD133-negativen Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aufwiesen. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen 5-FU konnte eine signifikante Anreicherung der CD133<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich bei Bestrahlung mit hohen Dosen eine höhere Resistenz der CD133<sup>+</sup>-Zellen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Kolonkarzinomlinie CT26 in vitro eine geringe CD133<sup>+</sup>-Subpopulation besitzt, jede Zelle jedoch unabhängig von der CD133-Expression in vitro zur Teilung fähig ist. Bei den in vivo Versuchen konnte eine Erhöhung der CD133<sup>+</sup>-Subpopulation beobachtet werden und eine definierte Frequenz tumorinitiierender Zellen bestimmt werden. Die in vivo Ergebnisse weisen somit auf einen hierarchischen Aufbau des Tumors entsprechend der Tumorstammzelltheorie hin. Für die Existenz einer CD133<sup>+</sup>-tumorinduzierenden Subpopulation spricht die Erkenntnis, dass der Anteil CD133<sup>+</sup>-Zellen über hohe Dosen an Bestrahlung und Chemotherapie angereichert werden konnte.

Die klinische Relevanz von Tumorstammzellen muss trotz aller vielversprechenden Ergebnisse noch bewiesen werden. Es wird jedoch weithin angenommen, dass zur Vermeidung von Rezidiven und zur effektiven Bekämpfung von Metastasen die gezielte Therapie tumorinitiierender Zellen ein essentieller Bestandteil der Tumorbehandlung

darstellen sollte. Mit neuen tumorstammzell-spezifischen Medikamenten könnte unter Umständen nicht nur der Tumor an seinem Fundament angegriffen werden, sondern im Vergleich zu den derzeitigen proliferationshemmenden Chemotherapien auch die Toxizität auf den Gesamtorganismus verringert werden.

## 6 Anhänge

### 6.1 TNM- und UICC-Klassifikation des Kolonkarzinoms

**Tabelle 6.1 TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms 2010<sup>120</sup>**

<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)
<b>T1</b>	Tumor infiltriert Submukosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das nicht peritonealisierte perikolische oder perirektale Gewebe
<b>T4</b>	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<b>T4a</b>	Tumor perforiert viszerale Peritoneum
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase(n) in 1- 3 regionären Lymphknoten
<b>N1a</b>	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
<b>N1b</b>	Metastasen in 2- 3 regionären Lymphknoten
<b>N1c</b>	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>N2a</b>	Metastasen in 4 - 6 regionären Lymphknoten
<b>N2b</b>	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen
<b>M1a</b>	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
<b>M1b</b>	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

**Tabelle 6.2 UICC-Klassifikation des Kolonkarzinoms 2010<sup>120</sup>**

<b>UICC</b>	<b>TNM</b>		
<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	T1, T2	N0	M0
<b>Stadium IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Stadium IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>Stadium IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Stadium III</b>	Jedes T	N1, N2	M0
<b>Stadium IIIA</b>	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
<b>Stadium IIIB</b>	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
<b>Stadium IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
<b>Stadium IVA</b>	Jedes T	Jedes N	M1a
<b>Stadium IVB</b>	Jedes T	Jedes N	M1b



## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kassette
Ak	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APC-Gen	Adenomatous polyposis coli-Gen
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all- <i>trans</i> -retinoic acid (all- <i>trans</i> -Retinsäure)
BMP4	Bone morphogenic protein 4
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Zenti
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsstruktur)
cDNA	Complementary DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
CK	Cytokeratin
D	Dalton
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionmolekül
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
FL	Fluoreszenz
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
Gy	Gray

---

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HLA	Humaner Histokompatibilitätskomplex
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
μ	Mikro
M	Mol
m	Milli, Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAb	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
Mio	Million(en)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMRI	Naval Medical Research Institute
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
NSG/NOG	NOD/Shi-scid, IL-2R gamma(null)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
P/S	Penicillin/Streptomycin
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SA-APC	Allophycocyanin-conjugated Streptavidin
sog.	sogenannte/r/s
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
v.a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

## 6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.3.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b> Stochastisches vs. hierarchisches Modell.....	- 10 -
<b>Abbildung 1.2</b> Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz der kolorektalen Karzinogenese.....	- 12 -
<b>Abbildung 1.3</b> Molekularer Aufbau des Oberflächenproteins CD133.....	- 15 -
<b>Abbildung 1.4</b> Schema zum Versuchsaufbau 1 bis 4:- 19 - Bestimmung des Anteils CD133 <sup>+</sup> -Zellen in vitro und in vivo. Untersuchung des Proliferationsverhaltens der CT26-Zellen in vitro und in vivo.....	- 19 -
<b>Abbildung 1.5</b> Schema zum Versuchsaufbau 5: Funktionelle Anreicherung tumorinduzierender Zellen durch Bestrahlung und Chemotherapie.....	- 20 -
<b>Abbildung 2.1</b> Schema zur Aussaat der Zellen für die Verdünnungsreihe in vitro..	- 29 -
<b>Abbildung 2.2</b> NMRI-Nacktmaus mit deutlichem Tumorwachstum an der rechten Flanke.....	- 33 -
<b>Abbildung 2.3</b> Frequenzbestimmung der Tumorstammzellen in vivo .....	- 35 -
<b>Abbildung 2.4</b> Aus der Nacktmaus frisch entnommener Tumor.....	- 36 -
<b>Abbildung 3.1</b> Prozentsatz der CD133-positiven Zellen in der CT26-Zellkultur ....	- 37 -
<b>Abbildung 3.2</b> Nacktmaus zeigt deutliches Tumorwachstum der rechten Flanke ...	- 38 -
<b>Abbildung 3.3</b> Wachstumskurve des Tumors über 10 Tage nach Injektion von 100.000 Zellen pro Seite.....	- 38 -
<b>Abbildung 3.4</b> Positivität der CT26-Zellen für CD44 .....	- 39 -
<b>Abbildung 3.5</b> Limiting Dilution Assay in vitro, P0-Generation: Aussaat der CT26 Zellen aus der Zellkultur in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2.000 Zellen. .	- 40 -
<b>Abbildung 3.6</b> Limiting Dilution Assay in vitro, P1-Generation: Aussaat der Tumorzellen, die aus einem soliden Tumor der Nacktmaus isoliert wurden, in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2.000 Zellen.....	- 41 -
<b>Abbildung 3.7</b> CFSE-Färbung .....	- 42 -
<b>Abbildung 3.8</b> Prozentuales Überleben der CT26-Zellen aus der Kultur nach Bestrahlung über einen Zeitraum von 0 bis 180 Sekunden. ....	- 44 -
<b>Abbildung 3.9</b> Prozentuales Überleben der CT-26 Zellen aus der Kultur nach Behandlung mit 5-FU von 0 µM bis 1000 µM.....	- 44 -

<b>Abbildung 3.10</b> Prozentsatz der überlebenden CD133 <sup>+</sup> -Zellen nach definierten Bestrahlungszeiträumen sowie Behandlung mit definierten Konzentrationen 5FU..	- 45 -
<b>Abbildung 3.11</b> Prozentsatz der CD133-positiven Zellen aus dem durch CT26-Zellen initiierten Tumor der Nacktmaus .....	- 47 -
<b>Abbildung 3.12</b> Langsameres und kontinuierliches Tumorwachstum bei Injektion von 100.000 Zellen und relativ frühem Wachstumsbeginn .....	- 51 -
<b>Abbildung 3.13</b> Rasch progredientes Tumorwachstum mit spätem Wachstumsbeginn bei Injektion von 1.000 Zellen .....	- 52 -

### 6.3.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1</b> Verwendete Antikörper und Sekundärreagenzien .....	- 24 -
<b>Tabelle 2.2</b> Konzentrationen der verwendeten Antikörper und Sekundärreagenzien-	25 -
<b>Tabelle 3.1</b> Verdünnungsreihe P0: Je 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>2</sup> und 10 CT26-Zellen aus der Zellkultur wurden vier Nacktmäusen subkutan in die Flanken injiziert.....	- 48 -
<b>Tabelle 3.2</b> Verdünnungsreihe P1: Je 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>2</sup> und 10 Zellen, die aus in Nacktmäusen induzierten Tumoren isoliert worden waren, wurden vier Nacktmäusen subkutan in die Flanken injiziert.....	- 49 -
<b>Tabelle 3.3</b> Dokumentation des Beginns des Tumorwachstums sowie der maximal erreichten Größe in der P0-Generation .....	- 52 -
<b>Tabelle 3.4</b> Dokumentation des Beginns des Tumorwachstums sowie der maximal erreichten Größe in der P1-Generation .....	- 53 -
<b>Tabelle 3.5</b> Vergleich der P0- und P1-Generation in Bezug auf medianen .....	- 54 -
Wachstumsbeginn des Tumors sowie maximal erreichte Tumorgroße.....	- 54 -
<b>Tabelle 6.1</b> TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms 2010 .....	- 82 -
<b>Tabelle 6.2</b> UICC-Klassifikation des Kolonkarzinoms 2010 .....	- 83 -

## 7 Literaturverzeichnis

1. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, Greene, F.L., Page, D.L., Fleming, I.D. *et al.* (Eds) Springer New York 2002 p.133.
2. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **7**, 3983–3988, doi:10.1073/pnas.0530291100, (2003).
3. Alison, M. R. & Islam, S. Attributes of adult stem cells, *J. Pathol.* **2**, 144–160, doi:10.1002/path.2498, (2009).
4. Alison, M. R. *et al.* Isolation of gut SP cells does not automatically enrich for stem cells, *Gastroenterology* **3**, 1012-3; author reply 1013-4, doi:10.1053/j.gastro.2006.01.075, (2006).
5. Alison, M. R. *et al.* Plastic adult stem cells: will they graduate from the school of hard knocks?, *J Cell Sci Pt* **4**, 599–603, (2003).
6. Alonso, L. & Fuchs, E. Stem cells of the skin epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11830–11835, doi:10.1073/pnas.1734203100, (2003).
7. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature* **7120**, 756–760, doi:10.1038/nature05236, (2006).
8. Barker, N. *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* **7229**, 608–611, doi:10.1038/nature07602, (2009).
9. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature* **7165**, 1003–1007, doi:10.1038/nature06196, (2007).
10. Bauer, N. *et al.* New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133), *Cells Tissues Organs (Print)* **1-2**, 127–138, doi:10.1159/000112847, (2008).
11. Beà, S. *et al.* BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas, *Cancer Res.* **6**, 2409–2412, (2001).
12. Bidlingmaier, S., Zhu, X. & Liu, B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells, *J. Mol. Med.* **9**, 1025–1032, doi:10.1007/s00109-008-0357-8, (2008).
13. Bjerknes, M. & Cheng, H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. IV. Effects of resecting 30% of the small intestine, *Am J Anat* **1**, 93–103, doi:10.1002/aja.1001600108, (1981).

14. Bjerknes, M. & Cheng, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors, *Gastroenterology* **1**, 7–14, (1999).
15. Blanpain, C., Horsley, V. & Fuchs, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves, *Cell* **3**, 445–458, doi:10.1016/j.cell.2007.01.014, (2007).
16. Bomken, S., Fiser, K., Heidenreich, O. & Vormoor, J. Understanding the cancer stem cell, *Br. J. Cancer* **4**, 439–445, doi:10.1038/sj.bjc.6605821, (2010).
17. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat. Med.* **7**, 730–737, (1997).
18. Brittan, M. & Wright, N. A. Gastrointestinal stem cells, *J Pathol* **4**, 492–509, doi:10.1002/path.1155, (2002).
19. Cheng, H. & Leblond, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types, *Am J Anat* **4**, 537–561, doi:10.1002/aja.1001410407, (1974).
20. Cheung, A. M. *et al.* Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential, *Leukemia* **7**, 1423–1430, doi:10.1038/sj.leu.2404721, (2007).
21. Clarke, M. F. & Fuller, M. Stem cells and cancer: two faces of eve, *Cell* **6**, 1111–1115, doi:10.1016/j.cell.2006.03.011, (2006).
22. Clevers, H. At the crossroads of inflammation and cancer, *Cell* **6**, 671–674, doi:10.1016/j.cell.2004.09.005, (2004).
23. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res* **23**, 10946–10951, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018, (2005).
24. Corbeil, D. *et al.* The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions, *J Biol Chem* **8**, 5512–5520, (2000).
25. Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A. & Huttner, W. B. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?, *Blood* **7**, 2625–2626, (1998).
26. Corbett, T. H., Griswold, D. P., JR, Roberts, B. J., Peckham, J. C. & Schabel, F. M., JR. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure, *Cancer Res* **9**, 2434–2439, (1975).
27. Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. Cancer stem cells: models and concepts, *Annu Rev Med*, 267–284, doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854, (2007).

28. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **24**, 10158–10163, doi:10.1073/pnas.0703478104, (2007).
29. D'Alterio, C. *et al.* Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma, *Cell Cycle* **22**, 4492–4500, (2010).
30. Elrick, L. J., Jorgensen, H. G., Mountford, J. C. & Holyoake, T. L. Punish the parent not the progeny, *Blood* **5**, 1862–1866, doi:10.1182/blood-2004-08-3373, (2005).
31. Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population, *Cell Death Differ.* **3**, 504–514, doi:10.1038/sj.cdd.4402283, (2008).
32. Fearon, E. R., Hamilton, S. R. & Vogelstein, B. Clonal analysis of human colorectal tumors, *Science* **4824**, 193–197, (1987).
33. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* **5**, 759–767, (1990).
34. Fialkow, P. J. Clonal origin of human tumors, *Biochim Biophys Acta* **3**, 283–321, (1976).
35. Fidler, I. J. & Kripke, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor, *Science* **4306**, 893–895, (1977).
36. Florek, M. *et al.* Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer, *Cell Tissue Res.* **1**, 15–26, doi:10.1007/s00441-004-1018-z, (2005).
37. Forbes, S., Vig, P., Poulson, R., Thomas, H. & Alison, M. Hepatic stem cells, *J Pathol* **4**, 510–518, doi:10.1002/path.1163, (2002).
38. Fortmeyer, H. P. Thymusaplastische Maus- (nu/nu) Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu)- Haltung, Zucht, Versuchsmodelle, *Schriftenreihe Versuchstierkunde* **8**, Verlag P. Parey, Berlin, Hamburg, (1981).
39. Frank, N. Y. *et al.* Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter, *J. Biol. Chem.* **47**, 47156–47165, doi:10.1074/jbc.M308700200, (2003).
40. Ghotra, V. P. S., Puigvert, J. C. & Danen, E. H. J. The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy, *Int. J. Radiat. Biol.* **11**, 955–962, doi:10.3109/09553000903242164, (2009).
41. Goodell, M. A. Multipotential stem cells and 'side population' cells, *Cytotherapy* **6**, 507–508, doi:10.1080/146532402761624638, (2002).
42. Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. & Mulligan, R. C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J. Exp. Med.* **4**, 1797–1806, (1996).
43. Goss, K. H. & Groden, J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor, *J. Clin. Oncol.* **9**, 1967–1979, (2000).

44. Groden, J. *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene, *Cell* **3**, 589–600, (1991).
45. Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Squatro, M. & Holland, E. C. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors, *Cancer Cell* **6**, 454–456, doi:10.1016/j.ccr.2006.11.008, (2006).
46. Hermann, P. C. *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer, *Cell Stem Cell* **3**, 313–323, doi:10.1016/j.stem.2007.06.002, (2007).
47. Hermiston, M. L. & Gordon, J. I. Organization of the crypt-villus axis and evolution of its stem cell hierarchy during intestinal development, *Am J Physiol* **5 Pt 1**, G813–22, (1995).
48. Heuser, M. *et al.* Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal, *Blood* **19**, 3983–3993, doi:10.1182/blood-2009-06-227603, (2009).
49. Hewitt, H. B. Studies of the quantitative transplantation of mouse sarcoma, *Br. J. Cancer* **3**, 367–383, (1953).
50. Hilbe, W. *et al.* CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer, *J. Clin. Pathol.* **9**, 965–969, doi:10.1136/jcp.2004.016444, (2004).
51. Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Goodell, M. A. & Brenner, M. K. A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy, *Cell Cycle* **2**, 203–205, (2005).
52. Husmann, G., ed. *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V* (Robert Koch-Inst.; GEKID, Saarbrücken, 2010).
53. Jemal, A. *et al.* Cancer statistics, 2009, *CA Cancer J Clin* **4**, 225–249, doi:10.3322/caac.20006, (2009).
54. Kelly, P. N., Dakic, A., Adams, J. M., Nutt, S. L. & Strasser, A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells, *Science* **5836**, 337, doi:10.1126/science.1142596, (2007).
55. Kennedy, J. A., Barabé, F., Poepl, A. G., Wang, J. C. Y. & Dick, J. E. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells", *Science* **5857**, 1722; author reply 1722, doi:10.1126/science.1149590, (2007).
56. LaBarge, M. A. & Bissell, M. J. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells?, *J. Clin. Invest.* **6**, 2021–2024, doi:10.1172/JCI36046, (2008).



- 
57. Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. & Schaffer, D. V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo, *Nat Neurosci* **1**, 21–27, doi:10.1038/nn983, (2003).
58. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature* **6464**, 645–648, doi:10.1038/367645a0, (1994).
59. Lessard, J. & Sauvageau, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells, *Nature* **6937**, 255–260, doi:10.1038/nature01572, (2003).
60. Levina, V., Marrangoni, A. M., DeMarco, R., Gorelik, E. & Lokshin, A. E. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties, *PLoS ONE* **8**, e3077, doi:10.1371/journal.pone.0003077, (2008).
61. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Res.* **3**, 1030–1037, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030, (2007).
62. Li, L. & Xie, T. Stem cell niche: structure and function, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 605–631, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525, (2005).
63. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol. Cancer*, 67, doi:10.1186/1476-4598-5-67, (2006).
64. Ma, S. *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells, *Gastroenterology* **7**, 2542–2556, doi:10.1053/j.gastro.2007.04.025, (2007).
65. Ma, S., Lee, T. K., Zheng, B.-J., Chan, K. W. & Guan, X.-Y. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway, *Oncogene* **12**, 1749–1758, doi:10.1038/sj.onc.1210811, (2008).
66. Massard, C., Deutsch, E. & Soria, J.-C. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation, *Ann. Oncol.* **11**, 1620–1624, doi:10.1093/annonc/mdl074, (2006).
67. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J Biophys Biochem Cytol*, 493–495, (1961).
68. McClanahan, T. *et al.* Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors, *Cancer Biol. Ther.* **4**, 419–426, (2006).
69. McDonald, S. A., Graham, T. A., Schier, S., Wright, N. A. & Alison, M. R. Stem cells and solid cancers, *Virchows Arch* **1**, 1–13, doi:10.1007/s00428-009-0783-1, (2009).
70. Miletto-González, K. E. *et al.* The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer, *Cancer Res.* **15**, 6660–6667, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3478, (2005).

- 
71. Miraglia, S., Godfrey, W. & Buck, D. A response to AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?, *Blood* **11**, 4390–4391, (1998).
  72. Miraglia, S. *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning, *Blood* **12**, 5013–5021, (1997).
  73. Mizrak, D., Brittan, M. & Alison, M. R. CD133: molecule of the moment, *J. Pathol.* **1**, 3–9, doi:10.1002/path.2283, (2008).
  74. Morita, Y., Ema, H., Yamazaki, S. & Nakauchi, H. Non-side-population hematopoietic stem cells in mouse bone marrow, *Blood* **8**, 2850–2856, doi:10.1182/blood-2006-03-010207, (2006).
  75. Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J. A. & Montell, C. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development, *Neuron* **1**, 67–81, (1994).
  76. Neuzil, J. *et al.* Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name?, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 855–859, doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.159, (2007).
  77. Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K. & Mitsufuji, S. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium, *Dig Dis Sci* **8**, 1523–1529, (2003).
  78. Nowell, P. C. Mechanisms of tumor progression, *Cancer Res* **5**, 2203–2207, (1986).
  79. O'Brien, C. A., Kreso, A. & Dick, J. E. Cancer stem cells in solid tumors: an overview, *Semin Radiat Oncol* **2**, 71–77, doi:10.1016/j.semradonc.2008.11.001, (2009).
  80. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice, *Nature* **7123**, 106–110, doi:10.1038/nature05372, (2007).
  81. O'Connell, J. B., Maggard, M. A. & Ko, C. Y. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging, *J Natl Cancer Inst* **19**, 1420–1425, doi:10.1093/jnci/djh275, (2004).
  82. Ohno, R., Asou, N. & Ohnishi, K. Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate, *Leukemia* **8**, 1454–1463, doi:10.1038/sj.leu.2403031, (2003).
  83. Ootani, A. *et al.* Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche, *Nat Med* **6**, 701–706, doi:10.1038/nm.1951, (2009).
  84. Pardal, R., Clarke, M. F. & Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer, *Nat. Rev. Cancer* **12**, 895–902, doi:10.1038/nrc1232, (2003).
  85. Park, I. K. *et al.* Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells, *Nature* **6937**, 302–305, doi:10.1038/nature01587, (2003).

86. Pear, W. S. *et al.* Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles, *J Exp Med* **5**, 2283–2291, (1996).
87. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells, *Nature* **7120**, 761–765, doi:10.1038/nature05349, (2006).
88. Potten, C. S. *et al.* Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1, *Differentiation* **1**, 28–41, (2003).
89. Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **3**, 973–978, doi:10.1073/pnas.0610117104, (2007).
90. Quintana, E. *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells, *Nature* **7222**, 593–598, doi:10.1038/nature07567, (2008).
91. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells, *Nature* **6938**, 409–414, doi:10.1038/nature01593, (2003).
92. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* **6859**, 105–111, doi:10.1038/35102167, (2001).
93. Ribatti, D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis, *J. Cell. Mol. Med.* **3**, 294–300.
94. Ricci-Vitiani, L., Pagliuca, A., Palio, E., Zeuner, A. & De, M. R. Colon cancer stem cells, *Gut* **4**, 538–548, doi:10.1136/gut.2007.127837, (2008).
95. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, *Nature* **7123**, 111–115, doi:10.1038/nature05384, (2007).
96. Rygaard, J. Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations, *Acta Pathol Microbiol Scand* **4**, 761–762, (1969).
97. Salsbury, A. J. The significance of the circulating cancer cell, *Cancer Treat. Rev.* **1**, 55–72, (1975).
98. Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 695–723, doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.092805, (2004).
99. Sangiorgi, E. & Capecchi, M. R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells, *Nat Genet* **7**, 915–920, doi:10.1038/ng.165, (2008).
100. Sawyers, C. L., Denny, C. T. & Witte, O. N. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis, *Cell* **2**, 337–350, (1991).
101. Schatton, T. *et al.* Identification of cells initiating human melanomas, *Nature* **7176**, 345–349, doi:10.1038/nature06489, (2008).

102. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R. & Morrison, S. J. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution, *Cell* **5**, 822–829, doi:10.1016/j.cell.2009.08.017, (2009).
103. Shmelkov, S. V. *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors, *J. Clin. Invest.* **6**, 2111–2120, doi:10.1172/JCI34401, (2008).
104. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature* **7015**, 396–401, doi:10.1038/nature03128, (2004).
105. Spillane, J. B. & Henderson, M. A. Cancer stem cells: a review, *ANZ J Surg* **6**, 464–468, doi:10.1111/j.1445-2197.2007.04096.x, (2007).
106. Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. & Kai, T. Stem cells find their niche, *Nature* **6859**, 98–104, doi:10.1038/35102160, (2001).
107. Stemple, D. L. & Anderson, D. J. Lineage diversification of the neural crest: in vitro investigations, *Dev Biol* **1**, 12–23, doi:10.1006/dbio.1993.1218, (1993).
108. Stoler, D. L. *et al.* The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression, *Proc Natl Acad Sci U S A* **26**, 15121–15126, (1999).
109. Storms, R. W. *et al.* Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**, 9118–9123, (1999).
110. Suetsugu, A. *et al.* Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells, *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 820–824, doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.128, (2006).
111. Taylor, M. D. *et al.* Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat Genet* **3**, 306–310, doi:10.1038/ng916, (2002).
112. Till, J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiat. Res.*, 213–222, (1961).
113. Todaro, M. *et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4, *Cell Stem Cell* **4**, 389–402, doi:10.1016/j.stem.2007.08.001, (2007).
114. Triel, C., Vestergaard, M. E., Bolund, L., Jensen, T. G. & Jensen, U. B. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics, *Exp Cell Res* **1**, 79–90, doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.032, (2004).
115. Varnum-Finney, B. *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling, *Nat Med* **11**, 1278–1281, doi:10.1038/81390, (2000).
116. Vogelstein, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development, *N. Engl. J. Med.* **9**, 525–532, doi:10.1056/NEJM198809013190901, (1988).

117. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. & Huttner, W. B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **23**, 12425–12430, (1997).
118. Weiswald, L.-B. *et al.* Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness, *Br. J. Cancer* **3**, 473–482, doi:10.1038/sj.bjc.6605173, (2009).
119. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors, *Nature* **6938**, 448–452, doi:10.1038/nature01611, (2003).
120. Wittekind C., Meyer H.-J. TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, (2010).
121. Wu, C. *et al.* Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential, *Cancer Res.* **17**, 8216–8222, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0999, (2007).
122. Yang, Z. F. *et al.* Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer, *Cancer Cell* **2**, 153–166, doi:10.1016/j.ccr.2008.01.013, (2008).
123. Yin, A. H. *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells, *Blood* **12**, 5002–5012, (1997).
124. Yoo, M.-H. & Hatfield, D. L. The cancer stem cell theory: is it correct?, *Mol Cells* **5**, 514–516, (2008).
125. Zagzag, D. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor, *Cancer Res.* **14**, 6178–6188, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4406, (2005).

## 8 Lebenslauf

### **PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Annette Christiane Neuwinger  
Geburtsdatum: 17.09.1984  
Geburtsort: Stuttgart

### **AUSBILDUNG**

1991 – 1995: Grundschule Mößling, Mühldorf  
1995 – 2004: Ruperti-Gymnasium Mühldorf  
2001 – 2002: Auslandsjahr Christiansburg High School, Virginia, USA  
06/2004: Allgemeine Hochschulreife  
2004 - 2011: Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg  
09/2006: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/2008 – 02/2009: Auslandssemester Università degli Studi di Verona, Italien  
02/2010 – 01/2011: Praktisches Jahr  
06/2011: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
  
Seit 09/2011: Assistenzärztin für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,  
Marienhospital Stuttgart

Stuttgart, 10.04.2012

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

### **ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN**

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung  
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stuttgart, 10.04.2012

## **10 Danksagung**

Mein Dank gilt zu allererst meinen Eltern, die mir durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung das Studium der Humanmedizin und somit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Danken möchte ich besonders meinem Doktorvater PD Dr. Marc Dahlke für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Er nahm sich stets die Zeit, auf alle Fragen rasch und umfassend einzugehen und ein zügiges Vorankommen der Arbeit zu unterstützen.

Weiterhin möchte ich Dr. Felix Popp und Dr. Elke Eggenhofer großen Dank aussprechen. Durch ihre stetige Präsenz und Anregungen zur Umsetzung des Themas trugen sie maßgeblich zum Gelingen und erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit bei.

Mein Dank gilt weiterhin Irina Kuçuk, Friederike Schrenk und Matthias Hornberg für die sorgfältige Einarbeitung und praktische Unterstützung bei meinen Versuchsanordnungen sowie für die freundliche Atmosphäre im Labor.

Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden Philipp Renner und Przemyslaw Slowik, mit denen die Arbeit im Labor stets ein angenehmes und nicht selten erheiterndes Unterfangen war.

Abschließend möchte ich meinem Freund Stefan Bachner danken, der mich immer aufs Neue motiviert und in allen Belangen unterstützt hat.